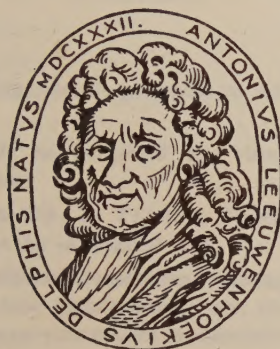


ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR
HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

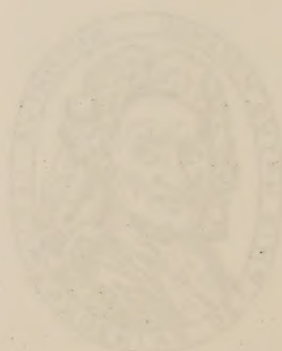
Vaste medewerkers: Prof. Dr. H. ALDERSHOFF (Utrecht), Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN (Groningen), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Dr. J. SMIT (Amsterdam), A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOH^a WESTERDIJK (Baarn), Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

'N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ, AMSTERDAM

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEEDERLANDSCH TUSCHENRIJFT VOOR
HYGIENE, MICROBIOLOGIE EN ZIEKTENLEER

Organ van de Nederlandsche Vereniging voor Microbiologie



De redactie van het D. W. C. DE GRADT, hooftredacteur, is tevens de red. van het TUSCHENRIJFT, hooftredacteur van het
Dit tijdschrift voor de Volksgezondheid is gratis.

De redactie van het D. W. C. DE GRADT, hooftredacteur, is tevens de red. van het TUSCHENRIJFT, hooftredacteur van het
Dit tijdschrift voor de Volksgezondheid is gratis.

N. V. SWETS EN ZEIJLINGER

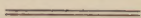
SOEKHANDEL EN DRUKK. N. V. SWETS EN ZEIJLINGER, AMSTERDAM

All rights reserved

INHOUD JAARGANG 1935.

	Blz.
DR. E. BEMELMANS †, Experiments proposed to solve definitely the influenza-problem	85
F. BEZEMER, Nog eens de aanwezigheid van visschen in de langzame zandfilters te Makassar	192
DR. A. C. BRANDWIJK en DR. A. TASMAN, Reiniging en Concentratie van Diphtherietoxine en -anatoxine VII	106
DR. T. FOLPMERS, Vergelijkende resultaten, verkregen door vervanging van pepton (Witte) door glutaminezuur, etc. als stikstofbron bij de Eykmanproef met oppervlaktewater in verschillende reinigingsstadia	343
DR. J. IDZERDA en JANNY WILDERVANCK, Vergelijkend onderzoek naar de hygiënische waarde van verschillende desinfectiemethoden van zwemwater II	68
G. KAPSENBERG, Over de techniek van de bacteriologische diagnose der diphtherie	142
DR. W. KAUFFMANN en DR. JAN SMIT, Over het gebruik van d-glutaminezuur bij het bacteriologisch wateronderzoek	334
DR. J. VAN DER LEE, Over den invloed van Röntgenstralen op het ontstaan van tuberculose na insputing van filtreerbaar tuberculose-virus	52
DR. W. H. F. C. MAJOEWSKIJ en DRS. J. P. A. TUENTER, Kaasvergiftigingen	388
DR. J. NEDERVEEN, Verslagen der Vergaderingen van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	8, 112, 303
DR. A. PONDMAN, Over de bereiding van anti-M en anti-N testvloei-stoffen	310
DR. A. W. POT, Over antigeen van Forssman in paratyphusbacterien	26
DR. A. W. POT, zie DR. A. TASMAN en DR. A. W. POT.	
DR. SARDJITO, Een mededeeling over het kweken van visschen in de langzame zandfilters te Makassar (Celebes N.O.I.) met het doel den looptijd der filters te verlengen	189
PROF. DR. N. SCHOORL, De bepaling van lipoide in bloed	122
DR. S. L. SCHOUTEN, De Micromanipulator	199
DR. JAN SMIT, zie DR. W. KAUFFMANN en DR. JAN SMIT.	

DR. A. TASMAN en DR. A. W. POT, De vorming van waterstof uit glucose en mierenzuur door de z.g. „rustende” colibacteriën I . . .	131
DR. A. TASMAN, De vorming van waterstof uit glucose en mierenzuur door z.g. „rustende” colibacteriën II	358
DR. A. TASMAN, zie DR. A. C. BRANDWIJK en DR. A. TASMAN.	
DR. W. AEG. TIMMERMAN, Over staphylotoxine en -toxoid	377
DRS. J. P. A. TUENTER, zie DR. W. H. F. C. MAJOEWSKIJ en DRS. J. P. A. TUENTER.	
DR. J. W. DE WAAL, Onderzoek van gepasteuriseerde melk	15
JANNY WILDERVANCK, zie DR. J. IDZERDA en JANNY WILDERVANCK.	
BOEKAANKONDIGING	109, 196
IN MEMORIAM PROF. DR. IR. N. L. SÖHNGEN (met portret)	1
PROFESSOR DR. D. A. DE JONG-STICHTING	111



In Memoriam Prof. Dr. Ir. N. L. Söhngen.

Den 24sten December 1934 overleed Prof. Dr. N. L. Söhngen, in leven hoogleeraar aan de Landbouwhoogeschool te Wageningen. Na een ernstige ziekte van 10 weken, waarvan het verloop zich echter alleszins gunstig liet aanzien, werden wij door een plotseling verergeren van den toestand opgeschrikt en slechts korten tijd daarna bereikte ons het bericht van zijn overlijden. Den 28sten December waren wij aanwezig bij zijn crematie te Westerveld, waar vele vrienden en vereerders hem de laatste eer bewezen. Prof. Dr. P. Verkade gaf in eenvoudige woorden een treffende schets van Söhngen als mensch en als denker. Zijn groote menschelijkheid, zijn losheid van conventie, zijn originaliteit, zijn toegewijde liefde bij de beoefening van wetenschap en kunst stempelden hem tot een mensch van grooten stijl. Zelfs oppervlakkige kennismaking deed hem reeds als zoodanig herkennen. Door zijn kunnen was hij tevens een geniaal mensch.

Nicolaas Louis Söhngen werd in 1878 te Oirschot geboren, hij bezocht de Rijks hogere burgerschool te Veendam en studeerde van 1898 tot 1902 aan de Polytechnische school te Delft voor scheikundig ingenieur. Voor zijn leermeester Prof. Dr. S. Hoogewerff, op wiens laboratorium hij gedurende de jaren 1902 tot 1904 assistent was, had hij een zeer hoge vereering. Daarna van 1904 tot 1906 werkte hij in het microbiologisch laboratorium te Delft onder leiding van Beyerinck, bij wien hij in 1906 promoveerde op een proefschrift getiteld: *„Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder den invloed van het organische leven”* (Juli 1906). Reeds van tevoren verscheen van hem een publicatie *„Over bacteriën, welke methaan als koolstofvoedsel en als energiebron gebruiken”* (Kon. Akad. v. Wetenschappen 1905).

Na zijn promotie was hij van 1906 tot 1908 verbonden aan

de margarinefabrieken van de Firma Verschuere en Co. te Rotterdam en van 1908 tot 1912 aan de margarinefabriek van den heer M. P. A. Proos te Middelburg. Uit deze periode dateeren een aantal publicaties op verschillend gebied n.l.:

Over ureumsplitsing bij afwezigheid der eiwitten (Kon. Akad. v. Wet., Amsterdam 1908),

Vetsplitsing door bacteriën, (idem Dec. 1910),

Microben lipase, idem Dec. 1910.

Thermotolerante lipase, idem Apr. 1911.

Van deze 3 publicaties werd in den 1en band van *Folia microbiologica* nog een samenvatting in de Duitsche taal gegeven:

Ueber Fettsplaltende Mikroben und deren Einfluss auf Molkereiprodukte und Margarine.

En hiermee deed Söhngen zijn intrede in de pas opgerichte Nederlandsche Microbiologische Vereeniging. Het was op de eerste vergadering dezer vereeniging, dat hij een voordracht over dit onderwerp hield. Op eenvoudige wijze kon door de vetbuisjesmethode het vermogen van anaerobe en aerobe microörganismen om vet te splitsen worden aangetoond. Interessant is de thermotolerante lipase, die kookhitte verdraagt en afgescheiden wordt door trypsine-vormende vetsplitsende bacteriën.

Ondertusschen vond Söhngen nog tijd om samen met Prof. Dr. G. van Iterson onderzoekingen te verrichten omtrent geconstateerde aantasting van het z.g. Manbarklak. Een rapport hierover verscheen in het Weekblad „De Ingenieur” van 18 Maart 1911.

In 1912 keerde Söhngen naar Delft terug, waar hij tot 1915 in het laboratorium van Beyerinck als assistent werkte. In 1913 verscheen een publicatie over „*Oxydatie van petroleum, paraffine, paraffineolie en benzine door microben*” (Kon. Akad. van Wetensch., 13 Mrt. 1913, Centralbl. II Bd 37, 1913). Deze mededeeling werd zeer snel gevolgd door een publicatie over de „*Einfluss von Kolloïden auf mikrobiologische Prozesse*” (Centralbl. II Bd 38, 1913). Een groot aantal processen wordt versneld door aanwezigheid van kolloïden (kiezelzuur, turf, filtreerpapier etc.) in de vloeibare voedingsbodems. Zoo wordt o.a. de stikstofbinding door *Azotobacter chroococcum* belangrijk bevorderd door aanwezigheid van kolloïdaal Si O₂. Turf, filtreer-

papier, bloedkool en tuingrond werken versnellend op de alcoholgisting (zie ook Folia microbiologica Jahrg. 2 Heft 1). Ook werd de invloed van humus, kolloïdaal kiezelzuur, ijzerhydroxyde en aluminiumhydroxyde, bloedkool en filtreerpapier op de amylumsplitsing, de azijnbacteriën, de ureumsplitsing, de denitrificatie, de nitrificatie en de petroleum oxydatie nagegaan.

In Folia microbiologica III (1914) vinden we vervolgens een mededeeling getiteld „*Ueber reduzierende Eigenschaften der Essigbakterien*” (medegedeeld op een der vergaderingen van onze vereeniging). Het bleek, dat azijnbacteriën, die normaal uit alcohol azijnzuur vormen, ook tot het omgekeerde proces in staat zijn; echter ook uit glucose, Ca-gluconaat en andere zouten van organische zuren werden geringe hoeveelheden alcohol gemaakt.

Met J. G. Fol publiceerde Söhngen een artikel in het Centralbl. f. Bakt. II Bd. 40 (1914) over „*Die Zersetzung des Kautschucks durch Mikroben*”. Twee Actinomyces-soorten werden beschreven, *A. elastica* en *A. fuscus*, die de rubber aantasten.

Zijn belangstelling voor den invloed van kolloïden op microbiologische processen was aanleiding dat Söhngen zich bezig ging houden met het maken van kolloïdale oplossingen. Zoo nam hij o.a. ook de bereiding van kolloïdale koolstof in studie. Het resultaat hiervan was een publicatie in het „Chemisch Weekblad” van 1914: „*Kolloïdaal opgeloste en gelatineuze koolstof*”.

In hetzelfde jaar verscheen een uitgebreid verslag over het onderzoek naar de oorzaken van het ontstaan van den stank der Haagsche grachten en aanwijzingen betreffende middelen ter verbetering. Het jaar 1914 was bijzonder productief. In het Centralbl. f. Bakt. Abt. II Bd. 40 verscheen nog: „*Umwandlungen von Manganverbindungen unter dem Einfluss mikrobiologischer Prozesse*”. In alkalisch milieu worden mangano-zouten omgezet tot mangani-oxyden. Bij de aerobe cellulose aantasting ontstaan oxyzuren, die de mangani-verbindingen overvoeren in oplosbare manganozouten. Deze vorming van oxyzuren uit cellulose is de oorzaak, dat Azotobacter met cellulose als koolstofbron in ruwculturen zich goed kan ontwikkelen. Dit onderzoek bracht Söhngen in contact met de Veenkoloniale haverziekte, een bodemziekte, die door geringe hoeveelheden mangaansulfaat kan genezen worden.

In 1915 volgde nu de benoeming tot directeur van de Microbiologische Afdeling van het Rijkslandbouwproefstation in Groningen. Hier werd hem het vraagstuk der *Veenkoloniale haverziekte* voorgelegd. Deze bodemziekte, die in de Groninger Veenkoloniën en ook elders op alkalisch bemeste zand- en veengronden optreedt, is met geringe hoeveelheden mangaan-sulfaat te bestrijden. Een tegenhanger van deze ziekte is de z.g. *Hooghalensche ziekte*, die zich juist op zure gronden voor-doet. Met behulp van *Azotobacter culturen* kon de zuurgraad van den grond getitreerd worden en het percentage daarin aanwezig vrij humuszuur worden bepaald. Beter ging dit met behulp van een indicator-methode, door diffusie van grond-suspensies in met indicatoren gekleurde agar-agar. Het bleek, dat de Veenkoloniale haverziekte slechts voorkwam op gronden waar de humuszuren geheel verzaadigd waren, terwijl tevens nog een overschot aan alkali aanwezig was. De Hooghalensche ziekte daarentegen trad slechts op, wanneer meer dan 50% van het humuszuur in vrijen toestand aanwezig was. (N. L. Söhngen, A. Kneteman en K. T. Wieringa, *Bepaling van het gehalte aan vrije en gebonden humus in zand en veengronden*. Versl. van Landbouwkundige onderzoekingen der Rijksland-bouwproefstations XXI 1917).

Toen Söhngen in 1917 in Wageningen tot hoogleeraar werd benoemd, was daar geen gelegenheid om het onderwijs in de microbiologie op behoorlijke wijze te geven. Wel was er een woonhuis als laboratorium ingericht, maar hier was geen gelegenheid voor het geven van colleges en practica. De bouw van een nieuw laboratorium werd echter door den minister beloofd, terwijl gelden beschikbaar werden gesteld voor de aanschaffing van den noodigen inventaris. Met zijn gewone voortvarendheid trok Söhngen aanstonds aan den arbeid om met de toegezegde middelen te komen tot een modern ingericht laboratorium, dat ook in de toekomst zou kunnen voorzien in de behoefte aan de Landbouwhoogeschool en in den herfst van 1919 werd voor den bouw de eerste spa in den grond gestoken. Wat dit aan schrijven en confereeren, meten en opnemen, geduld oefenen en afwachten een tijd gekost heeft is niet te beschrijven. Eindelijk kwam in 1922 het nieuwe gebouw gereed en kon het onderwijs in de microbiologie aan de landbouwhoogeschool, dat van onder af moest worden opgebouwd pas goed een aanvang

nemen. Het laboratorium is ingedeeld in twee deelen, waarvan een voor colleges en candidaatspractica bestemd is en het andere voor eigen onderzoekingen, voor laboranten, die gedurende de ingenieursstudie aan speciale onderwerpen komen werken en voor promovendi. Bij het laboratorium ligt een proeftuin, met perceelen van verschillende bemestingstoestand en zuurgraad, zoodat voor de practica steeds biologisch uiteenlopend materiaal aanwezig is. De voor proefnemingen minder geschikte overblijvende strooken en randen wist Söhngen dusdanig op te vullen, dat een harmonisch geheel ontstond, geheel overeenkomstig zijn aard. Aan de hooge opvatting, die Söhngen van zijn taak had, waarvan hij getuigde in de rede uitgesproken bij de aanvaarding van het hoogleeraarsambt, heeft hij trouw vastgehouden. Zijn colleges en publicaties getuigen hiervan. Zijn onderzoekingen hadden plaats op zuiver wetenschappelijk gebied, terwijl hij als lid van den octrooiraad en als lid van de commissie van advies omtrent de landbouwkundige aangelegenheden betreffende de drooggekomen Zuiderzeegronden voortdurend met vraagstukken uit de practijk in aanraking kwam. Ook van andere zijde werd uit de practijk dikwijls zijn advies ingewonnen.

De officieele opening van het nieuwe laboratorium viel samen met de herdenking van den geboortedag van Louis Pasteur op 27 Dec. 1822—1922. De Microbiologische Vereeniging vergaderde toen in Wageningen. De woorden van Pasteur, waarmee hij zijn herdenkingsrede besloot, waren geheel in zijn geest: „*La science dans notre siècle est l'âme de la prospérité des nations et la source vive de tout progrès. Sans doute la politique avec ses fatigantes et quotidiennes discussions semble être notre guide. Vaine apparence. Ce qui nous mène ce sont quelques découvertes scientifiques et leurs applications. L'avenir appartient à la science. Malheur aux peuples qui fermentaient les yeux sur cette vérité*”.

Van zijn publicaties noem ik nog de volgende:

P. E. Verkade en N. L. Söhngen. *De aantasting van cis-transisomere onverzadigde zuren door schimmels*. (Kon. Akad. v. Wetensch. Dl. XXVIII en Centralbl. f. Bakt. II Bd. 50, 1922).

N. L. Söhngen en C. Coolhaas. *De vergisting van galactose door Sacch. cerevisiae*. (Tijdschr. v. vergelijkende geneesk. enz. Dl IX, 1922).

F. C. Gerretsen, A. Grijns, J. Sack, N. L. Söhngen. *Das Vorkommen eines Bakteriophagen in den Wurzelknöllchen der Leguminosen* (Centralbl. f. Bakt. II Bd. 60, 1923).

N. L. Söhngen en W. S. Smith. *De invloed van de temperatuur op de ontleding van waterstofperoxyd door persgist*. (Tijdschr. v. vergelijkende geneeskunde enz. Dl X, 1923).

N. L. Söhngen en C. Coolhaas. *Der Einfluss ultravioletter Lichts auf die Alkoholgährung*. (Wochenschrift für Brauerei XL).

N. L. Söhngen en A. Grijns. *Over de afsterving van den bacteriophaga van Bacillus Danicus*. (Kon. Akad. v. Wetensch. XXXIV, No. 8).

N. L. Söhngen en K. T. Wieringa. *Permeabiliteitsbepalingen met Saccharomyces cerevisiae*. (Kon. Akad. van Wetensch. Dl XXXVI, No. 10, 1928).

In het studiejaar 1928—1929 was Söhngen Rector-magnificus der Landbouwhoogeschool. Zijn denkbeelden over het wezen van den *bacteriophaga* zette hij toen uiteen in zijn rede op 9 Mrt. 1929 ter gelegenheid van den 11en verjaardag der Landbouwhoogeschool. Door het vinden van bacteriën, die in hun voeding uitsluitend aangewezen zijn op andere bacteriën, — de bacteriophagie is dus niet beperkt tot den bacteriophaga —, was zijn meening dat de bacteriophaga als een levend organisme op te vatten is, belangrijk versterkt. N. L. Söhngen, *Heterobacteriolyse en Bacteriophagie* (Kon. Akademie van Wetenschappen Dl XXXVI, No. 10). Velen onzer zullen zich de discussies nog herinneren, die op een vergadering van de Nederlandsche Microbiologische Vereeniging gevoerd werd, naar aanleiding van de onderzoekingen van Den Dooren de Jong over het produceeren van den bacteriophaga door bepaalde stammen van *B. megatherium*, (Verg. Ned. Microbiologische Vereeniging). Ofschoon Söhngen de proeven van Den Dooren de Jong ten volle bevestigen kon, was hij niet overtuigd van de juistheid der interpretatie.

In de laatste jaren van zijn leven heeft Söhngen zich nog in het bijzonder geïnteresseerd voor het probleem der *mitogenetische stralen*. De vele proeven hierover in zijn laboratorium genomen, gaven geen overtuigende resultaten over het bestaan van een mitogenetisch effect.

De beteekenis van het experiment stelde Söhngen ver

boven die van theoretische beschouwingen. Deze kunnen slechts dienen om richting te geven aan het onderzoek. Slechts wat door maat en gewicht als resultaat van de proef is vastgelegd heeft blijvende waarde.

Het noodlot heeft gewild, dat Söhngen's laatste werk over het verdwijnen van waterstof onder invloed van microben geheel bij zijn eerste onderzoek aansluit. Helaas heeft hij dit niet kunnen voltooien. Het onderzoek is echter zoover gevorderd, dat op de bereikte resultaten kan worden voortgebouwd.

Veel te vroeg is Söhngen gestorven, voor zijn gezin, voor zijn werk, voor de landbouwhoogeschool. Zij, die het voorrecht hadden hem van nabij te kennen kunnen niet genoeg de rijkdom waardeeren, die hun leven door omgang met hem heeft gekregen.

K. T. WIERINGA.

Verslag van de vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie

gehouden Zaterdag 10 November 1934, voorm. 10.30 uur,
in het Pathologisch Instituut der Faculteit voor
Diergeneeskunde, Biltstraat 166, te Utrecht.

Volgens de presentielijst hebben 50 leden en 8 gasten de vergadering bijgewoond.

Na opening door den voorzitter, *Prof. P. C. Flu*, doet de *secretaris* mededeeling, dat is

Ingekomen het verslag van de Nederlandsche Centrale Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek over het jaar 1933. Dit wordt voor kennisgeving aangenomen.

Kascommissie.

Als leden der kascommissie worden wederom aangewezen *Dr. L. E. Den Dooren de Jong* en *Dr. T. Folpmers*. Beide heeren verklaren zich bereid ook ditmaal die taak te vervullen.

Verkiezing bestuurslid.

Met ingang van 1935 is de penningmeesteres, *Dr. H. H. de Wolff*, aan de beurt van aftreding als bestuurslid.

De *voorzitter* zegt namens het bestuur *Mej. de Wolff* hartelijk dank voor hetgeen zij in het belang der vereeniging heeft gedaan en vooral voor de nauwgezette wijze, waarop deze zich met den taak van het beheer der geldmiddelen heeft belast.

De vergadering geeft van hare instemming met het gesprokene blijk.

Als opvolgster beveelt het bestuur aan *Mej. Dr. J. C. H. Broek*, die, hiernaar gevraagd, zich bereid heeft verklaard een benoeming tot bestuurslid en tot penningmeesteres te aanvaarden.

Mej. Broek wordt daarna als zoodanig gekozen. Haar zal van deze benoeming kennis worden gegeven.

Lidmaatschap tegen lagere jaarlijksche bijdrage.

Ingevolge de toezegging, gedaan in de vorige vergadering (zie dit Tijdschrift Deel I, no. 3), stelt het bestuur voor in het reglement een bepaling op te nemen, die het mogelijk maakt als „temporair lid” tot de Vereeniging toe te treden tegen een bijdrage van 2.50 gld. per jaar, ingaande 1 Januari 1935.

Na voorlezing van het ontwerp, zooals dit door het bestuur is opgemaakt, door den *secretaris*, wordt op verzoek van *Prof. van Oyen* aan de mogelijkheid tot dit lidmaatschap nog eenige verdere uitbreiding gegeven, waarna de betreffende bepaling wordt vastgesteld als volgt:

„Studenten, promovendi, assistenten en zij, die op eenigerlei wijze hunne werkzaamheden verrichten op een laboratorium eener Universiteit of Hoogeschool of hiervoor om andere redenen meenen in aanmerking te komen, welke niet in staat zijn de volle contributie te betalen, kunnen, na indiening van een gemotiveerd verzoek bij het bestuur, temporair lid worden der Vereeniging tegen een bijdrage van 2.50 gld. per jaar. Dit lidmaatschap geeft dezelfde rechten als het gewoon lidmaatschap, met uitzondering van het recht op het ontvangen van het tijdschrift.

Personen, die lid of temporair lid der Vereeniging zijn geweest, kunnen zich, indien zij niet in staat zijn de volle contributie te betalen, eveneens met een gemotiveerd verzoek, tot het bestuur wenden om de voordeelen van het temporair lidmaatschap te genieten of te blijven genieten.

Het bestuur neemt in al deze gevallen een beslissing en geeft den betrokkenen van zijn uitspraak kennis”.

De voorzitter wekt de leden op om, indien hun personen bekend zijn, die voor dit lidmaatschap in aanmerking komen, deze op het bestaan van de nieuwe, gunstige bepalingen opmerkzaam te maken.

Zomervergadering.

Als tijd en plaats voor de a.s. zomervergadering worden aangewezen Zaterdag 11 Mei te Rotterdam.

Bij de *Rondvraag* verlangt niemand het woord, waarna wordt overgegaan tot het

Wetenschappelijk gedeelte.

Dr. H. W. Julius houdt, als eerste spreker, een voordracht met demonstratie over „*Anaërobe Kweektechniek*”, zooals die in het Hygiënisch Laboratorium te Utrecht in gebruik is. Deze techniek berust op het, door *Fortner* te Berlijn weer opgehaalde, oude beginsel, om een sterk zuurstofverbruikend microörganisme in de afgesloten ruimte met voedingsbodem te enten.

Eerst wordt het dichtmaken der platen besproken, daarna de mogelijkheid de gevonden stammen gemakkelijk in buizen in zuiveren kweek te houden en tenslotte een kleine anaërobe flesch (gebruikt wordt een inmaakpot) om fermentatieproeven in te zetten. Alle methoden maken gebruik van *Bac. prodigiosus* om de zuurstof weg te nemen.

Enkele voordeelen van deze wijze van handelen worden in het licht gesteld, zonder daarbij in het minst iets af te willen doen aan de waarde der andere, algemeen bekende methoden.

Bespreking.

Dr. Ruys zegt, bij de afsluiting der *Fortner*platen deze eerst te verwarmen en daarna te sluiten op de wijze als een *Weck-flesch*.

Dr. Vedder acht de bloedbenzidinemethode eenvoudiger.

Spreker antwoordt, dat de *Fortner*platen meer voldoen, omdat hierbij anaërobe kiemen groeien, die bij de bloedbenzidinemethode niet tot ontwikkeling komen.

Dr. Van der Walle geeft in overweging, in plaats van de onaangenaam riekende *Bac. prodigiosus* gebruik te maken van *Vibrio elbensis* als zuurstofverbruikend organisme, waaraan *Dr. Folpmers* nog toevoegt *Oidium lactis*.

Een vraag van *spreker*, of deze kiemen niet zwermen, in welk geval zij niet in aanmerking kunnen komen, wordt ontkenkend beantwoord.

De heer *T. S. Zwanenburg* behandelt daarna „*Paratyphus-infectie in eendeneieren*”.

Het over dit onderwerp ingesteld onderzoek zal in een proefschrift uitvoerig worden medegedeeld. Om deze reden wordt ook afgezien van het opnemen der op de voordracht gevolgde, uitvoerige gedachtenwisseling.

Dr. Ir. T. Y. Kingma Boltjes doet vervolgens een mededeeling over „*Nitrificerende bacteriën*”, welke verantwoordelijk zijn voor de oxydatie van ammoniak via nitriet tot nitraat in den bodem.

Ondanks ijverig zoeken slaagde aanvankelijk niemand de betreffende bacteriën af te zonderen. Dit gelukte eerst in 1890 aan *Winogradsky*. Zijn onderzoek bracht aan het licht, dat het proces in twee trappen door twee verschillende microörganismen voltrokken wordt. Verder deed hij de zeer verrassende ontdekking, dat de betreffende bacteriën in hun geheele energie-behoefte voorzien door de oxydatie van ammoniak, onderscheidenlijk nitriet, en dat zij voor den opbouw van hun celbestanddeelen koolzuur assimileeren. Organische stoffen zij niet alleen overbodig maar zelfs schadelijk. De onbekendheid met dit feit is de voornaamste oorzaak van het niet gelukken der isolatie door de onderzoekers vóór *Winogradsky*. Doch ook na hem hadden weinigen succes. Uit de literatuur krijgt men den indruk, dat het aanhouden van de reïncultures zeer onzeker is. Door den spreker, die zelf ook veel moeite heeft gehad de bacteriën af te zonderen, worden de voorkomende moeilijkheden besproken. De bacteriën groeien langzaam en de koloniën op kiezelzuurplaten blijven zeer klein (20—50 μ) en hard, waardoor het afzonderen onder het microscoop met behulp van een micropincet moest geschieden. Ook bij dit onderzoek bleek de groei der bacteriën onzeker.

Later werd gevonden, dat de samenstelling van den gebruikten voedingsbodem niet juist was. Calcium is hierin onmisbaar, speelt blijkbaar een belangrijke rol in het ionenevenwicht. Zeer tegen de verwachting in, werkte een weinig organische stof bij de reïncultures gunstig.

Houdt men met deze twee factoren rekening, dan levert het afzonderen en kweken van deze twee organismen geen moeilijkheden op. De uitkomsten van potentiaalmetingen maken aannemelijk, dat de gunstige invloed van organische stof daarop berust, dat zij medewerkt aan het tot stand komen van een gunstig reductieniveau.

Na deze voordracht wordt het noenmaal gehouden, waarna in de middagvergadering *Prof. Dr. W. Schuettner* het woord krijgt over den „*Spiril van Sardjittjo (cardiopyrogenes)*”.

Dit microörganisme werd door *Sardjitjo* door middel van caviaenting in Nederlandsch-Indië gekweekt uit het bloed van een patiënt, welke drie maanden ziek was en leed aan pericarditis met haemorrhagisch exsudaat.

De spiril is kurketrekkervormig; bij kweken uit de buikholte van de cavia kan men organismen te zien krijgen met 4, 6, 8 en ook enkele met 10 windingen, die over het algemeen vlak zijn. De parasieten zijn gemakkelijk te kleuren volgens Giemsa en Gramnegatief; aan het uiteinde ziet men iets als een flagel. Caviaenting gelukt gemakkelijk, de hierbij optredende verschijnselen zijn niet heftig; ook het konijn is vatbaar, enting van muizen is niet gelukt. Behalve in het peritoneum zijn de spirillen ook aanwezig in het bloed; hierin kunnen zij niet microscopisch worden aangetoond. Door het enten van bloed uit het hart heeft men echter in drie dagen een cultuur.

Een goede voedingsbodem is bouillon met konijnenbloed; echter gaat het organisme op een kunstmatigen voedingsbodem spoedig ten gronde, zoodat om de 8 dagen moet worden overgeënt. Vandaar, dat het langs den gewonen weg niet mogelijk was een cultuur naar Nederland over te brengen. Dank zij echter de snelle Pelikaanvlucht, was *Prof. Schueffner* in staat een nog levende cultuur in zijn bezit te krijgen.

Spreker deelt verder nog een en ander mede over de immunologie.

Bespreking.

Dr. Van der Walle vraagt, of de parasiet anaëroob groeit.

Spreker zegt, dat deze aëroob goed groeit doch ook anaëroob te kweken is.

Dr. Timmerman vraagt, of bij de cavia onvatbaarheid optreedt.

Spreker antwoordt hierop bevestigend.

Op een vraag van *Dr. de Vogel*, of bij de proefdieren ook pericarditis wordt waargenomen, zegt *spreker*, dat dit in het geheel niet het geval is; trouwens, de proefdieren worden niet heftig ziek en blijven in leven.

Dr. van Thiel vraagt naar de werking van salversan.

Spreker heeft hiernaar geen onderzoek ingesteld; *Sardjitjo* heeft met salversan wel een tijdelijke verbetering kunnen verkrijgen.

De heer *A. Bos* spreekt vervolgens over „*Flagellatendiphtherie bij duiven*”.

Spreker heeft proefondervindelijk met bacterievrije rein-cultures van trichomonaden kunnen aantoonen, dat een bij duiven veelvuldig voorkomende ziekte met fibrineus-necrotiseerende ontstekingen in mond en keel (diphtherie”, „geel of mondzwam”, „Soorkrankheit”) primair veroorzaakt wordt door *Trichomonas columbae*, dezelfde flagellaat, die de trichomoniasis van lever en andere inwendige organen teweegbrengt. Deze waarneming verdient daarom belangstelling, omdat over het algemeen in de menselijke ziektekunde de trichomonaden als vrij onschuldige organismen worden aangemerkt.

Daarna houdt de heer *G. M. van Waveren* een voordracht over „*Het kweken van virus in bebroede kippeneieren*”.

Verschillende filtreerbare smetstoffen kunnen in de chorio-allantoïs van bebroede eieren tot vermeerdering gebracht worden. *Rous* kweekte het kippensarcoom; *Woodruff* en *Goodpasture* slaagden met de besmetting van vogelpokvirus en, in samenwerking met *Buddingh*, van neurovaccine-*Levaditi*; *Stevenson* en *Butler* kweekten op dezelfde wijze dermovaccine. *Burnet* vermeerderde de rij van in het ei kweekbare filtreerbare smetstoffen met laryngotracheïtis-, kippenpest- en vesiculair stomatitisvirus.

Frenkel en *Spreker* hebben getracht het mond en klauwzeervirus in het zich ontwikkelende ei tot vermeerdering te brengen. Volgens de gewone techniek, waarop hun de voortkweeking en vermeerdering van neurolapine-*Gaillardo* zeer goed gelukte, slaagde de ei-infectie niet; evenmin door wijziging te brengen in de broedtemperatuur of in de manier en de plaats van inspuiting bij verschillende stadia van ei-ontwikkeling.

Bespreking.

Op een vraag van *Prof. van Oyen* antwoordt *spreker*, dat de eieren worden betrokken van een modelfokkerij; de mislukkingen bij het overenten kunnen niet worden geweten aan de eieren, maar aan andere oorzaken.

Prof. Schueffner merkt op, dat het is gelukt het virus van

gele koorts in vele passages in leven te houden, ook in weefselcultures op dekglasjes. Misschien zijn eicultures ook voor het onderzoek van gele koorts te gebruiken.

Niemand meer aan het woord verlangend, sluit de *voorzitter* te ruim vier uur, na dankbetuiging aan *Prof. van Oyen* voor de genoten gastvrijheid, de geanimeerde vergadering.

's-Gravenhage, November 1934.

De secretaris

H. J. VAN NEDERVEEN.

Onderzoek van gepasteuriseerde Melk

DOOR

Dr. J. W. DE WAAL.

In 1903 heeft Ringeling — Tijdschr. v. toegepaste Scheikunde en Hygiëne, Dl. VI, 367 — een methode aangegeven voor het onderzoek van gepasteuriseerde melk, welke berust op het zoo mogelijk aantoonen van bacillus coli communis, welke soort in rauwe melk nimmer wordt gemist, al komt zij in de meeste gevallen slechts in betrekkelijk gering aantal daarin voor. Ringeling vermeerdert nu het aantal colibacillen door het bedeeën van zuren bouillon met de te onderzoeken melk en broeden van het mengsel bij 37° C. gedurende 24 uren. Daarna wordt gekweekt op gelatineplaten en nader onderzocht uit welke bacteriënsoort de daarop gevormde koloniën bestaan. Gelet wordt op zelfbeweeglijkheid, de reactie in neutraalrood—Rothberger, de gisting in glucose-bouillon en de vorming van indol. De schrijver heeft zijn methode ontworpen uit behoefte aan een eenvoudige werkwijze voor het beoordeelen van gepasteuriseerde melk — hij noemt ook nog gesteriliseerde en ziektekiemvrije melk — waarvoor hij de telling van het aantal bacteriën-koloniën op gelatineplaten uit een zekere hoeveelheid melk gekweekt, in het algemeen niet doelmatig acht. Soms bevat de melk een groot aantal bacteriën bij goede pasteurisatie en in andere gevallen een klein, terwijl hieronder toch een soort is te vinden, welke bij deugdelijke bewerking der melk in het gepasteuriseerde product niet aanwezig had mogen zijn. „Vindt men — aldus Ringeling — op deze wijze bacillus coli communis bijna zonder uitzondering in gewone „rauwe” koemelk, in goed bereide ziektekiemvrije, gepasteuriseerde en hoog-gepasteuriseerde melk zal dit organisme nimmer voorkomen. Wij weten

toch reeds sedert 1889 uit de onderzoeken van Van Geuns, dat bacillus coli communis gedood wordt door het inwerken van een temperatuur van 59° C. gedurende 5 minuten en van 60.5° C. gedurende één minuut".

Saltet, Voordrachten over Gezondheidsleer, 1913, 377, schrijft: „Moeilijker is de beoordeeling van gepasteuriseerde melk. In Amsterdam is vroeger getracht dit te bereiken door de weinig talrijke bacteriën, die op de cultuurplaten met zulke melk gegoten, groeien, op sporenvorming te onderzoeken; maar dat gaf onbetrouwbare uitkomsten, hetgeen ons nu niet meer verwondert. De methode van Ringeling geeft de beste uitkomsten. Hij redeneert als volgt. In elke melk, ook die van de zindelijkste boerderij, is *B. coli communis* te vinden; dit organisme sterft bij verwarming, zooals die bij pasteurisatie wordt toegepast; in gepasteuriseerde melk mag hij derhalve niet voorkomen".

De Codex Alimentarius, No. 1, Melk, 1907, 44, beschrijft ook het onderzoek van gepasteuriseerde melk. In de eerste plaats wordt genoemd het quantitatieve onderzoek, door Ringeling en Saltet minder doeltreffend geacht. Echter worden de uitgestelde gelatineplaten nader onderzocht ter beantwoording van de vraag, of zij wellicht een bacteriënsoort vertegenwoordigen, welke tegen pasteurisatie niet bestand is. Daarna wordt in de tweede plaats genoemd de coliproef volgens Ringeling. Echter doet de Codex op de bij deze proef gebruikte gelatineplaten zoeken naar proteus-koloniën, of naar coliforme, niet vervloeiende koloniën. Een aangetroffen colisoort wordt bovendien nog onderzocht op het bestand zijn tegen pasteurisatie. De 2e Aangevulde Druk van den Melkcodex, verschenen in 1912, is ten opzichte van het hier behandelde onderwerp gelijk aan den 1sten Druk. Echter doet de 3e Aangevulde Druk van 1920, de gelatineplaten, welke voor het quantitatieve onderzoek werden gebruikt, niet meer onderzoeken op proteus-koloniën en coliforme-koloniën. Wel blijft, afgezien van enkele technische verschillen, de proef van Ringeling, gelijk aan die in den 1sten en den 2den Druk, gehandhaafd. Ook wat betreft het onderzoek van reinculturen, gekweekt van coliforme-koloniën op de gelatineplaten gegroeid, op het bestand zijn tegen pasteurisatie.

Dan komt het Melkbesluit, 1925, waarvan artikel 13, onder

2 bepaalt: De aanduiding „gepasteuriseerd” mag bij melk en melkproducten en als zoodanig aangeduide waar uitsluitend gebezigd worden, indien: *a.* zij geen kweekbare coli-bacillen bevatten *b.* enz. In de Bijlage bij dit besluit wordt onder „Methoden van Onderzoek, VIII, Bacteriologisch onderzoek van gepasteuriseerde melk, sub 2, Coliproef”, voorgeschreven een mengsel van melk en zuren bouillon, in de verhouding door Ringeling aangegeven, gedurende 24 uren te kweken bij 35° C. en verder wordt slechts gezegd: De cultuur wordt op de aanwezigheid van coli-bacillen nader onderzocht. De mede in de Bijlage opgenomen Lijst van Voedingsbodems, geeft de bereiding aan van de beide ook door Saltet t.a.p. genoemde agar-voedingsbodems, nl. die volgens Conradi—Drigalski en volgens Endo.

Het Melkbesluit van 1929 bracht geen verandering.

Het Warenwet-besluit eischt dus, afgezien van het quantitative bacteriologische onderzoek, slechts de afwezigheid van coli-bacillen, zonder aan te geven wat onder die aanduiding is te verstaan. Toch zijn verschillende opvattingen mogelijk. Men kan op grond van de geschiedenis van het onderzoek der gepasteuriseerde melk onder „coli-bacillen” verstaan een soort, welke tegen pasteurisatie niet bestand is; echter legt het Melkbesluit op geenerlei wijze eenig verband met de geschiedenis van de coli-proef. Wellicht mede als gevolg hiervan zien verschillende voedingsmiddelonderzoekers, die de bepalingen van het besluit moeten toepassen in „coli-bacillen”, en dit is in overeenstemming met de beteekenis van deze organismen bij het onderzoek van drinkwater, de aanwijzers van faecale verontreiniging. Zij denken dus aan „faecale coli”, welke aanduiding hierna zal worden gebruikt, evenals „niet resistente” coli of stam, voor het geval een bacteriënsoort niet bestand is tegen pasteurisatie.

Wordt uitgegaan van deze gedachte aan faecale coli, dan moet de onderzoeker ten slotte uitmaken, of een zuiver gekweekte stam als zoodanig moet worden aangemerkt, of slechts een vertegenwoordiger is van de groote en zeer gevarieerde coli-aërogenesgroep. Dit is het aan de waterbacteriologen welbekende probleem.

De hiervoor aangeduide vraag wordt inderdaad gesteld en beantwoord. De meest eenvoudige opvatting, welke in de

praktijk van een laboratorium werd aangetroffen, was deze, dat een overvloedige ontwikkeling van bacteriën in den met melk bedeeden en bebroeden zuren bouillon, de aanwezigheid van coli-bacillen in den zin van het Melkbesluit bewijst. Ook zijn er onderzoekers die de culturen van melk in zuren bouillon uitschrijven op Endo-platen. Verschijnen de bekende roode koloniën, dan achten zij coli-bacillen aanwezig. Weer anderen stellen de eigenschappen vast van de soort, welke de kolonie heeft gevormd. Maar, zooals begrijpelijk is, bestaat er geen eenstemmigheid over de vraag, welke eigenschappen een stam moet bezitten om faecale coli te mogen heeten. Zoo wordt in een geval de eisch gesteld, dat een stam behalve de algemeene eigenschappen der coli's — Gram-negatief, vergisting van glucose en lactose onder zuurvorming — het vermogen moet bezitten indol te vormen, maar daarbij ook thermotolerant moet zijn in den zin van Eijkman. Dit laatste vordert weder het laboratorium van den warenkeuringsdienst te Amsterdam niet, zooals uit het volgende zal blijken.

In „Het Algemeen Zuivel- en Melkhygiënisch Weekblad”, 1923, nos. 51 en 52, heeft Van Oyen een overzicht gegeven van hetgeen is verhandeld ter gelegenheid van „The National Milk Conference”, in November 1923 te Londen gehouden, wat betreft het onderwerp „Pasteurisation”, waaraan door hem nog eenige beschouwingen zijn vastgeknoopt. In dit overzicht wordt gewezen op het waarschijnlijk gedood zijn van typhusbacillen in melk, waarin door pasteurisatie de meestal in mengmelk voorkomende coli-bacillen zijn te gronde gegaan. Echter wordt het begrip „coli-bacil” niet nader omlijnd en wordt ook gewezen op het bestaan van coli-bacillen, behalve in het darmkanaal der warmbloedigen, in mest en verontreinigd water. Blijkbaar gaan hier de gedachten meer uit naar de coli-aërogenes-groep dan naar de faecale coli. En in overeenstemming hiermee merkt de schrijver op: „Men moet zich niet voorstellen, dat alle kiemen van eenzelfde „soort” op dezelfde temperatuur en op hetzelfde tijdstip afsterven”. Hij vraagt dus niet naar de onmiddellijke herkomst van een coli-stam, b.v. uit het darmkanaal, maar naar zijn resistentie tegenover de pasteurisatie.

In het hiervoor genoemde weekblad (1925, 101) is door Den Dooren de Jong (keuringsdienst van waren, Rotterdam) geschreven over het aantoonen van *B. coli* in gepasteuriseerde

melk. Ook deze deskundige vraagt niet naar het voorkomen van faecale coli, maar zoekt naar vertegenwoordigers van de coli-aërogenes-groep. Zelfs geeft hij daaraan zeer ruime grenzen, als hij schrijft: „Toch doet men goed bij het onderzoek van gepasteuriseerde melk althans, niet al te sterk vast te houden aan de lactose vergisting, en in dit geval tot coli-aërogenes te rekenen, de (sporenlooze) bacteriën welke glucose kunnen vergisten”.

Bij den Gezondheidsdienst voor Vee in Friesland, wordt bij het onderzoek van melk, ter beoordeeling van de goede winning, rekening gehouden met de geheele coli-aërogenes-groep. In het Officieel Orgaan van den Algemeenen Nederlandschen Zuivelbond, 1924, 268, heeft A. H. V.(eenbaas) voor het onderzoek van melk op coli-achtigen (coli-aërogenes) aanbevolen een oplossing van pepton, gal, lakmoes en lactose (pegallac), welke in het laboratorium van den genoemden dienst wordt gebruikt. Eén cm^3 melk of minder wordt gemengd met 15 cm^3 der oplossing, in een gistingsbuisje bij 37°C . bebroed; na 18 en na 24 uren wordt nagegaan of gisting is opgetreden. De aard van het gisting in een buis veroorzakende organisme wordt verder nagegaan, maar een scherpe omlijning van het begrip „coli” wordt niet gegeven.

Het Melkcontrôlestation der V.V.Z.M., te 's-Gravenhage, gebruikte, volgens een particuliere mededeeling van den Directeur, Dr. Y. M. Kramer, de werkwijze aangegeven door Den Dooren de Jong, zie hiervoor. De laatstgenoemde bedeeft 5 cm^3 van een oplossing met 1% natriumtaurocholaat in leidingwater, diepblauw gekleurd met lakmoesoplossing in een reageerbuis met een Durhambuisje, met 5 cm^3 gepasteuriseerde melk, waarna het mengsel gedurende 2 dagen wordt bebroed bij 37°C . Pepton en lactose worden aan de oplossing niet toegevoegd, daar eiwitverbindingen en melksuiker in de melk in zeer ruime mate aanwezig zijn. Gelet wordt op gasvorming, reductie en roodkleuring. Vertoont de cultuur kleuromslag en gasvorming dan wordt op Endo-agar uitgestreken. Ontstaan daarop typische coli-koloniën, dan wordt de aanwezigheid van coli-bacteriën aangenomen. In twijfelgevallen wordt een zuiver gekweekte stam onderzocht op de vorming van indol. In den loop van 1934 wijzigde het Melkcontrôlestation zijn methode. Opgehoopt wordt nu in brillantgroen-lactose-natriumtaurocho-

laat-oplossing, zooals is aangegeven in de 6th Edition van de Standard Methods of Milk Analysis (1934). Bij gasvorming wordt weer op Endo-agar afgestreken en een nader onderzoek ingesteld ten opzichte van koloniën, welke waarschijnlijk door coli-achtigen zijn gevormd. Van de zuivere culturen uit deze koloniën gekweekt wordt nagegaan de kolonievorm, de reactie Voges—Proskauer, die op methylrood en de vorming van indol. Het onderzoek heeft ten doel de onderscheiding tusschen colibacteriën en de overige soorten van de coli-aërogenes-groep. Daarbij wordt dan vooral aandacht geschonken aan de reactie van Voges—Proskauer. De mededeeling van het Melkcontrôle-station V.V.Z.M.- sluit dan met de volgende opmerkingen: „Het komt ons voor, dat een dergelijke differentieering, althans wat gepasteuriseerde flesschen melk betreft, eigenlijk overbodig is, ware het niet dat het Melkbesluit de afwezigheid van colibacteriën eischt. Aanwezigheid van bacteriën van de coli-aërogenes groep wijst toch volgens onze meening op onvolgende pasteurisatie of op infectie na de pasteurisatie. In dit geval lijkt het ons van minder belang of de gevonden soort tot de min of meer faecale stammen is te rekenen of niet”.

De opvattingen, gangbaar bij den keuringsdienst van waren te Amsterdam, kunnen nu worden besproken. In het Chemisch Weekblad, 1930, 663, beschrijft Van Raalte, onder den titel „Nieuwe Coli-Titer” een werkwijze voor het onderzoek van melk op de aanwezigheid van „coli”, waaromtrent in het laboratorium onder zijn directie onderzoekingen zijn verricht door Lerner. Deze gaat uit van het standpunt — zie Nederl. Tijdschr. voor Hygiëne, Microbiologie en Serologie, VI, 1932, 183 —, dat een gekweekte stam alléén „coli” mag worden verklaard, indien hij melk doet stollen, indol vormt, neutraalrood doet fluoresceeren en in glucose- en lactosepeptonwater gas produceert. Omgekeerd mag — aldus Van Raalte —, daar geen andere bacteriën dan coli en cholera de indol-reactie geven en met de aanwezigheid van cholera geen rekening behoeft te worden gehouden, uit het positief uitvallen van de indol-reactie in een bacteriëncultuur worden geconcludeerd tot de aanwezigheid van coli. Den Dooren de Jong (Chem. Weekbl. 1930, 686) noemt dit standpunt volkomen onjuist. Behalve coli en cholera zijn er nog vele andere bacteriën, welke indol vormen. Ook staat het, naar hij opmerkt, geenszins vast, dat zelfs coli's van

faecalen oorsprong steeds een positieve indol-reactie geven. Dit oordeel kan worden onderschreven, ondanks hetgeen Van Raalte meedeelt in het Chem. Weekbl. 1931, 19; deze verwijst overigens naar de komende publicatie van Lerner.

Het uitgangspunt van den laatstgenoemde is hiervóór reeds aangegeven wat betreft de omschrijving van het begrip „coli”. Verder zoekt hij naar dit organisme in gepasteuriseerde melk en in modelmelk, teneinde uit de afwezigheid daarvan te besluiten tot het óók niet voorkomen van den typhusbacil. „Coli” is in dezen gedachtengang dus duidelijk en uitsluitend „faecale coli”; aan niet-resistenten wordt niet gedacht. En voortgaande op dit pad wordt het Melkbesluit onjuist weergegeven. Lerner zegt: „Aangezien het onderzoek op coli — volgens het Melkbesluit — geschiedt door ophooping in zuren bouillon, uitslijken op Endo en nader onderzoek op de vijf genoemde eigenschappen, waaronder de vorming van indol, wordt de aanwezigheid van coli alleen bewezen geacht, indien er ook indolvorming is”. Het is echter geheel onjuist, dat het Melkbesluit een nader onderzoek aangeeft van de ophoopingscultuur in zuren bouillon. Het genoemde Koninklijk besluit zegt alléén, wat hiervoor reeds is aangegeven, d.w.z.: het Melkbesluit doet de ophoopingscultuur nader onderzoeken op coli-bacillen, maar het geeft niet aan op welke wijze dit moet geschieden en wat onder „coli” is te verstaan.

In tegenstelling met het Amsterdamsche standpunt dient onder coli, bij het onderzoek van gepasteuriseerde melk in het Melkbesluit genoemd, te worden verstaan een voorbeeld van een tegen pasteurisatie niet-resistent organisme. Dit is de eenige mogelijke opvatting, welke blijkens de hiervóór aangehaalde literatuur in wezen door zeer verschillende deskundigen in Nederland wordt aangehangen. Goed gepasteuriseerde melk mag geen vertegenwoordigers bevatten van de coli-aërogenes-groep, voor zoover zij tegenover pasteurisatie niet resistent zouden blijken. Of de aangetroffen stammen indologeën of anindologeën zijn, of wel dan niet thermotolerant in den zin van Eijkman, doet niet ter zake; het gaat niet om faecale coli.

Het zijn trouwens niet alleen Nederlandsche deskundigen, die de hiervóór uitgesproken meening deelen. In den loop van 1934 is verschenen in het Handbuch van Abderhalden en als afzonderlijke uitgave: J. Demeter, Bakteriologische Unter-

suchungsmethoden von Milch, u.s.w. Hierin wordt op bl. 32, als algemeene methode voor de beoordeeling van melk, beschreven het onderzoek op de „Coli-aërogenes-Gruppe”, met behulp van gasvorming in een oplossing van lactose, pepton, rundergal en gentiaanviolet, welke volgens Demeter voor het selectief kweken van coli bijzonder geschikt is. Op het onderscheiden tusschen coli- en aërogenes-stammen wordt door hem niet ingegaan. Hij acht dit verschil voor de waterhygiëne van meer beteekenis dan voor die der melk. Dan, bij „Untersuchung der pasteurisierten Milch”, blz. 48, wordt ter beoordeeling van de deugdelijkheid der pasteurisatie dezelfde coli-aërogenes-proef aangegeven. Echter wordt nadrukkelijk daarop gewezen, dat verschillende onderzoekers, o.m. De Jong en De Graaff, (Ned. Wbl. voor Zuivelbereiding en Veeteelt, no. 37 en 38, 1906), in tegenstelling met de resultaten van Van Geuns, hebben gewezen op het voorkomen van coli-stammen, welke tegen pasteurisatie bestand blijken. Deze resistente coli-stammen staan bij de beoordeeling van gepasteuriseerde melk, op eene lijn met de sporenvormers. Bij het onderzoek naar de deugdelijkheid der pasteurisatie in het bedrijf, verlangt Demeter, op grond van het bestaan dezer resistente stammen, van de gebruikte apparaten, dat zij in den regel geen coli-bacteriën in leven laten „die eine Hitzeresistenz von 20 bis 30 Minuten bei 62° C. besitzen”. Dit is weder het oude uitgangspunt bij het onderzoek van gepasteuriseerde melk: coli wordt gezien als tegen pasteurisatie niet resistent organisme.

Wordt het hiervoor uiteengezette standpunt ten opzichte van het onderzoek van gepasteuriseerde melk als juist erkend, dan volgt daaruit het inzicht, dat er onderscheid bestaat tusschen de grondslagen waarop het aangegeven onderzoek en dat van rauwe, dus ook van modelmelk, met behulp van coli berust. Bij gepasteuriseerde melk wordt de coli-techniek gebruikt voor het vaststellen van een voldoende verwarming en bij rauwe melk tot het aantoonen van verontreinigingen. Deze kunnen bestaan uit faecale stoffen, afkomstig van de koe, maar ook van een andere herkomst zijn. Hier kan worden gedacht aan onrein melkgereedschap, of aan verontreinigd bedrijfswater. Maar juist omdat de verontreiniging van rauwe melk een zoo verschillende herkomst kan hebben, heeft het ook bij het onderzoek van dit product geen zin uitsluitend te denken aan en te

zoeken naar faecale coli. En hiermede vervalt de redeneering, waarop de indol-proef voor het onderzoek van rauwe en van gepasteuriseerde melk volgens Lerner berust, ook voor het eerstgenoemde product.

Zooals reeds is aangegeven, gebruiken verschillende deskundigen voor het onderzoek van gepasteuriseerde melk en ook van rauwe melk, overeenkomstige methoden. Deze berusten met eenige, waarschijnlijk ondergeschikte, verschillen alle op het onderdrukken van den groei van andere stammen dan die der coli-aërogenes-groep, in een oplossing welke melksuiker bevat, een stof welke nagenoeg zonder uitzondering onder zuurvorming worden vergist door de stammen van de laatstgenoemde bacteriën-groep. Met de uitzonderingen behoeft bij het onderzoek van melk geen rekening te worden gehouden, al betreft Den Dooren de Jong in zijn beschouwing wel de stammen, welke geen melk-, maar wel druivensuiker kunnen vergisten.

Nu heeft Lerner in zijn mededeeling over de methode-V(eenbaas), welke eveneens op de vergisting van lactose berust, een minder gunstig oordeel uitgesproken. Hij acht de door hem voorgeslagen indol-proef meer geschikt voor het beoogde doel: het opsporen van colibacillen in melk. Zijn werkwijze is zeer eenvoudig en doet denken aan de proef van Schardinger, vroeger vooral bij het onderzoek van drinkwater in gebruik. Lerner mengt 1 cm³ melk, of een decimale verdunning daarvan in peptonwater, met 9 cm³ van deze voedingsvloei-stof, welke bestaat uit een oplossing in water van 1% pepton, 1% keukenzout en 0.025% natriumcarbonaat. Na 24 uren te zijn geplaatst bij 37° C., worden de culturen volgens Ehrlich onderzocht op indol. Is de reactie positief dan wordt de aanwezigheid van coli in de melk bewezen geacht, en omgekeerd. De ontwerper van dezen nieuwen coli-titer wijst zelf op eenige gebreken van zijn methode, maar het ligt niet in de bedoeling deze en andere nu te bespreken. Echter wordt in verband met hetgeen hiervoor is opgemerkt, waaruit de veelvuldige toepassing van de lactosevergisting blijkt, wel gewezen op een bepaald gedeelte van de kritiek op de werkwijze-V(eenbaas). Deze vermeldt het onderzoek van 998 monsters gepasteuriseerde melk en 24 monsters modelmelk, volgens V(eenbaas) en volgens Ringeling (ophooping in zuren bouillon). Van alle bij de beide ophoopings-

methoden verkregen culturen zijn Endo-platen aangelegd en „van alle monsters zijn de ontstane kolonies onderzocht op de boven aangegeven 5 eigenschappen”. Dat zijn dus de eigenschappen, welke hiervóór reeds zijn genoemd en waartoe ook behoort het vermogen indol te vormen. Van de 1022 onderzochte monsters gaven 84 gasontwikkeling in de pegallacvloeistof (V.); in 17 van deze gevallen bleken echter geen coli-bacteriën aanwezig te zijn. Volgens de opvatting van den Amsterdamschen keuringsdienst wil dit zeggen, dat geen indolgene bacteriën werden gevonden. Echter volgt daaruit geenszins, dat de stammen, welke in de 17 bestreden gevallen gas hadden gevormd, geen coli's waren in den ruimeren zin, dus stammen uit de coli-aërogenes-groep. Alle omstandigheden in aanmerking genomen is dit zelfs zeer waarschijnlijk. En dan keert zich de kritiek van Lerner tegen de werkwijze van V(eenbaas) en van anderen, die ook gebruik maken van het vermogen der coli-aërogenes-groep tot het vergisten van melksuiker, tegen zijn eigen indol-proef, welke zich uitsluitend het ontdekken van faecale coli ten doel stelt. Zooals gezegd blijven andere bezwaren tegen de indol-proef hier onbesproken.

Het Melkbesluit bekommert zich om al de aangegeven vragen niet en eischt in gepasteuriseerde melk slechts de afwezigheid van kweekbare coli-bacillen. Deze eisch wordt feitelijk een definitie, bij gebrek aan eenige andere bepaling van het begrip „gepasteuriseerd”, in het besluit. De verdere eischen door het laatste aan gepasteuriseerde melk gesteld, zijn van quantitatieven aard en houden geen begripsbepaling in. Maar wat een coli-bacil nu ten slotte is, laat het Melkbesluit in het midden, zoowel ten opzichte van de biochemische eigenschappen, als van de resistentie tegenover temperatuursverhoogingen. De eenige aanwijzing omtrent de eigenschappen van coli-bacillen, welke in het besluit wordt gevonden, is de volgende. De Bijlage bij het besluit vermeldt in de: Lijst van Voedingsbodems, onder Endo-agar: „Men gaat na, door uitzaaien van coli-bacillen, of de voedingsbodem goed is. De kolonies hiervan moeten donkerrood zijn door de fuchsine, die zij in vrijheid stellen”. Maar dit zegt toch weinig.

Samenvattende kan het volgende worden gezegd.

Het zoeken naar Coli-bacteriën heeft in rauwe melk, dus

ook in modelmelk, ten doel verontreinigingen op te sporen. Deze kunnen van verschillenden aard zijn. Behalve aan faeces van de koe moet worden gedacht aan onvoldoende gereinigd melkgerei en aan verontreinigd bedrijfswater. Ook de melkers kunnen een bijdrage leveren en de aarde van de melkplaats in de weide, evenals het stof in den stal. En daarom dient te worden gerekend met de geheele coli-aërogenes-groep, indien het voorkomen van coli-bacteriën wordt gebruikt als aanwijzing en maat voor de verontreiniging der melk. Het heeft geen goeden grond slechts rekening te houden, met indologene stammen, of die, welke de reactie van Voges—Proskauer geven, of thermotolerant zijn in den zin van Eijkman, daarbij uitgaande van het denkbeeld, dat het gaat om „echte” faecale coli, het loodsmannetje van den typhusbacil. Of bij het onderzoek van rauwe melk de gevonden coli's resistent zijn, d.w.z. bestand tegen pasteurisatie, of niet, heeft geen beteekenis.

Bij het onderzoek van gepasteuriseerde melk zoekt men naar coli als vertegenwoordiger van bacteriënsoorten, welke tegen pasteurisatie niet bestand zijn. De geheele coli-aërogenes-groep kan hiervoor dienst doen. Van een zuiver gekweekten coli-stam moet dan worden nagegaan, of deze wel dan niet bestand is tegen pasteurisatie. In het eerste geval is zijn voorkomen voor de beoordeeling van de genoemde bewerking van geen beteekenis. De indolvorming en de andere reacties bij rauwe melk reeds genoemd doen niet ter zake.

De eisch van het Melkbesluit, dat gepasteuriseerde melk geen kweekbare coli-bacillen mag bevatten, is voor meer dan één uitleg vatbaar en geeft dientengevolge aanleiding tot verwarring en misverstand. Dit kan ten nadeele strekken van een goede handhaving van het besluit. Een andere eisch zal moeten worden gesteld. Men zal dienen terug te keeren tot het oorspronkelijke uitgangspunt, door het stellen van den eisch, dat gepasteuriseerde melk geen bacteriënstammen mag bevatten, welke tegen pasteurisatie niet bestand zijn. Hierbij zijn de stammen uit de coli-aërogenes-groep, om verschillende redenen, zeer geschikte indicatoren. De genoemde oorspronkelijke methode is tijdroovend en heeft ook waarschijnlijk nog wel andere bezwaren, maar een betere is nu niet bekend. Bovendien zal zij slechts in bepaalde gevallen behoeven te worden toegepast en niet bij elk onderzoek van gepasteuriseerde melk.

En ten slotte is het onderzoek van een zuiver gekweekten stam op allerlei andere eigenschappen, als indol-vorming, e.d. ook niet zoo eenvoudig.

Tegen welke „pasteurisatie” een zuiver gekweekte stam bestand zal moeten zijn, dient met bepaling van temperatuur en tijdsduur der verwarming te worden vastgelegd, waardoor dan tevens het begrip „pasteurisatie” is bepaald, zonder een voorschrift te geven tenopzichte van de techniek dier bewerking.

Leeuwarden, December 1934.

Over Antigeen van Forssman in paratyphusbacteriën

DOOR

Dr. A. W. POT

Bacterioloog aan het Instituut.

Inleiding.

In 1911 ontdekte Forssman¹⁾ dat de bloedwei van konijnen, ingespoten met een waterige suspensie van cavia-organen, maar *niet* met caviabloed, de eigenschap heeft ook in sterke verdunning roode bloedlichaampjes van schapen en geiten te haemolyseeren.

Evenals de haemolyse door serum van konijnen, met schapebloedlichaampjes behandeld, behoeft ook deze merkwaardige reactie, die zoo volkomen in tegenspraak is met elk oppervlakkig specifiteitsbegrip, de aanwezigheid van complement. Voortgezet onderzoek leerde, dat orgaansuspensies van tal van dieren (o.a. paard, kat, kip), die overigens geenerlei gelijkenis of verwantschap toonen, zich in dit opzicht als cavia-organen gedragen: worden ze bij dieren, die deze eigenschap missen (bijv. konijn, rat), ingespoten, dan verwekken zij schapebloedhaemolysinen. Al naar het voorkomen of ontbreken van het antigeen van Forssman heeft men talrijke diersoorten bij een „cavia“- en een „konijne“-reeks kunnen onderbrengen. Volslagen onregelmatig is het F-antigeen in de dierenwereld *niet* verspreid. Landsteiner en Fox²⁾ vonden het bij *alle* onderzochte hond- en katachtigen.

Eigenaardig is de verspreiding van het F-antigeen onder de menschen; alleen zij, die tot de bloedgroepen A en AB behooren, hebben erythrocyten, welke F-antigeen bevatten (Schiff en Adelsberger³⁾).

In plaats van Forssman's antigeen resp. antilichaam, worden vaak de termen „heterologisch”, „heterogenetisch” of „heterophiel” antigeen en antilichaam gebruikt. Nauwkeuriger is het echter om „van Forssman” „heteroloog”, „heterogenetisch” en „heterophiel” niet als synoniemen te gebruiken, maar het F-antigeen als den voornaamsten vertegenwoordiger van de grootere groep der heterogenetische antigenen te beschouwen.

Indien men bijv. meent, dat Proteus x 19 niets uitstaande heeft met den verwekker van vlektyphus, dan kan men, met Forssman, ook de agglutinenen voor dezen stam in de bloedwei van vlektyphuspatiënten „heterogenetisch” noemen.

Van de overige eigenschappen van F-antigeen en antilichaam mogen nog de volgende worden opgesomd:

1. F-antigeen bindt zich met de heterogenetische haemolysinen; men kan er deze antilichamen mee uit het serum verwijderen, gelijk de agglutinenen met een homologen bacteriestam.

2. Indien complement aanwezig is, wordt ook dit bij de antigeen-antilichaamreactie gebonden.

3. Behalve oplossen, kan het F-antilichaam de erythrocyten ook agglutineeren.

4. Alcoholische extracten uit F-antigeenhoudende organen binden zich met het F-antilichaam, geven hiermede een praecipitatie en complementbinding, maar verwekken, bij konijnen ingespoten, zelf geen haemolysinen. De in alcohol en aether oplosbare, in aceton onoplosbare z.g. lecithinefractie bleek de hierbij werkzame stof te zijn; met een geëigend vreemd eiwit gemengd, herkrijgt dit „hapteen” de volledige antigeenfunctie (Landsteiner c.s. 1923).

5. De bloedwei van het met F-antigeen behandelde konijn is bij intraveneuze inspuiting giftig voor de cavia, een verschijnsel dat men met „anaphylaxie renversée” heeft betiteld en wel omdat *niet* het antigeen in het antilichaam bevattend proefdier gelijk bij de anaphylaxieproef, maar omgekeerd het antilichaam in de antigeenhoudende cavia wordt gespoten. De *verschijnselen* zijn overigens dezelfde.

6. Het antigeen is thermostabiel.

Het konijn kan dus drieërlei schapebloedhaemolysinen herbergen:

1. „Normale”, niet door eenigerlei kunstgreep verwekte

haemolysinen, in, volgens Forssman, zoowel bij de afzonderlijke dieren, als bij éénzelfde konijn op verschillende tijdstippen sterk wisselende concentratie (minimale haemolyseerende dosis 0.05—0.8 ccm).

Deze normale haemolysinen behooren, hetgeen de zaak niet eenvoudiger maakt, tot het type der F-haemolysinen; ze worden door cavianiersuspensies e.d. gebonden (Friedemann 1917) en de bloedwei van een onbehandeld konijn met hoogere haemolysinentiter kan de cavia onder anaphylactische verschijnselen dooden.

2. „Homologe” haemolysinen, na herhaalde inspuiting van schapebloedlichaampjes. Deze haemolysinen worden *ten deele* door cavianier gebonden; schapebloedlichaampjes bevatten F-antigeen.

3. „Heterogenetische” haemolysinen door F-antigeen.

Het homologe serum haemolyseert in tegenstelling tot het normale en het heterogenetische *ook* runderbloedlichaampjes, zij het in zwakkere verdunning en bevat dus een mengsel van onderling verschillende haemolysinen; een deel behoort tot het F-type, een ander deel toont een groepsreactie met runderbloedlichaampjes. Het overeenkomstig gedrag van normale haemolysinen en heterogenetische heeft bij sommigen de meening doen postvatten, dat de z.g. heterogenetische eenvoudig door „aspecifieke” prikkels vermeerderde normale haemolysinen zouden zijn. Forssman verzet zich hier tegen op twee gronden: 1. de enorme stijging van den titer, die men vaak waarneemt en die niet te vergelijken is met de bescheiden antistofvermeerdering, die men van „aspecifieke” prikkels gewend is en 2. het feit, dat ook diersoorten, waarbij geen normale haemolysinen voorkomen (o.a. witte ratten) heterogenetische vormen. Overigens raakt deze vraag die van veel wijdere strekking naar het verband, dat er *in het algemeen* bestaat tusschen „normale” en na immunisering verkregen antistoffen (zie Topley, An outline of Immunity, London 1933).

Behalve in de organen van vele dieren zou het antigeen van Forssman ook in sommige bacteriesoorten voorkomen. Bij toeval nam Rothacker 4) (1913) waar, dat sera van konijnen, die herhaaldelijk met een mengsel van paratyphus B- en Gaertner-bacteriën waren ingespoten, bij aanwezigheid van

complement schapebloedlichaampjes haemolyseerden. Rothacker zelf, die zijn sera voor een geheel ander doel, namelijk verbetering van het onderzoek der vleeschvergiftigingen, bereidde, ging hierop niet verder in; later werd in deze richting stelselmatig verder gezocht en naast bevestigingen van Rothacker's waarneming (Kurt Meyer 5), Eisler 6), Seiffert 7) e.a.) treft men in de literatuur mededeelingen aan van onderzoekers, die de aanwezigheid van F-antigeen in paratyphus-bacteriën bestreden (o.a. Tsuneoka 8), Fujita 9), Jijima 10)). Nu heeft men zich bij pogingen om F-antigeen aan te toonen, veelal beperkt tot haemolysinenbindingsproeven in sera met cavianier, of andere orgaansuspensies bereid. De „cavia” en „konijne”-reeksen zijn trouwens bijna geheel volgens deze methode opgesteld. Slechts betrekkelijk weinig dieren zijn op grond van immuniseeringsproeven geëvalueerd. Bij bacteriën voert deze werkwijze echter op een dwaalspoor. Koshiro Fujita 9) nam waar, dat cavianiersuspensie wel de haemolysinen uit een Shigaserum maar omgekeerd Shigabacteriën *niet* die uit een cavianierserum konden binden. Het antigeen van Forssman in organen en in bacteriën zou dus niet identiek zijn. Fujita meent, dat het F-antigeen uit verschillende factoren opgebouwd kan zijn, waarvan de bacteriën er sommige missen. Men zou dan toch als een cavianierserum met bijv. Shigabacteriën behandeld is, ten minste een *titerdaling* verwachten, hetgeen men in werkelijkheid niet waarneemt. Volgens Fujita zouden de aan orgaansuspensies en bacteriën gemeenschappelijke factoren daartoe ontoereikend zijn.

De meeste onderzoeken over F-antigeen bij bacteriën betroffen vertegenwoordigers van de Coli-typhus-dysenteriegroep. Behalve de paratyphus B, Gaertner- en Shigabacteriën onderzocht men typhus-, colibacillen en andere salmonellae, n de reeds genoemde.

Over typhus- en colibacteriën is men het eens; deze betten naar aller meening geen F-antigeen; één typhusstam van verr schijnt hierop een uitzondering te maken. Gaertner-acteriën zouden niet of hoogstens zwak (Seiffert 7), Kurt eyer 5) werkzaam zijn.

Afzonderlijke vermelding verdient het werk van Kurt Meyer; deze kwam tot de slotsom, dat de haemolysinen uit een paratyphus-B-serum behalve door orgaansuspensies slechts

gebonden worden door de paratyphustypes van de B-groep, volgens Kauffmann's indeeling, maar niet door die van de A-C- of Gaertnergroepen; omgekeerd verliest een C-serum zijn haemolysinen slechts na behandeling met een vertegenwoordiger van de C-groep.

In den allerlaatsten tijd hebben Mary Shaw Shorb en G. Howard Bailey 11) het gedrag van talrijke bacteriesoorten in dit opzicht nagegaan; onder meer zouden strepto- en pneumococcen, gonococcen, micrococcus catharrhalis, pasteurella lepi-septica positieve uitkomsten leveren. In scheikundigen zin is er een niet onbelangrijk verschil tusschen het F-antigeen der orgaansuspensie en dat van bacteriën; het haptien der eerste schijnt uit vetachtige stoffen, dat der bacteriën uit polysacchariden te bestaan.

Eigen onderzoek.

In de volgende bladzijden zullen de uitkomsten worden medegedeeld van een aantal proeven, die ik nam om mij van de al of niet aanwezigheid van F-antigeen in paratyphusbacteriën te overtuigen. Tevoren moge echter een en ander omtrent de techniek zoowel van de titerbepaling van haemolytische „amboceptoren” als van de haemolysinenbinding worden besproken.

Titreering haemolytische amboceptor. Wanneer men zich van de literatuur over F-antigeen op de hoogte tracht te stellen, wordt men getroffen door de talrijke wijzen, waarop men den titer der sera bepaalt. Met eenige overdrijving kan men zeggen dat ieder er zijn eigen waardebepaling op na houdt, waardoor een onderlinge vergelijking der resultaten onmogelijk is. Forssman stelt bijv. den eisch dat het serum nog in een hoeveelheid van 0.006 ccm haemolyse toont, vóór hij aanneemt, dat de waargenomen haemolysinenstijging, werkelijk aan heterogeen-tisch antigeen te danken is. Om van dezen titer eenigen indruk te krijgen, staat slechts één weg open: de vergelijking van Forssman's werkwijze met de methode, die men zelf volgt.

Enkele sera, zoowel van met schapebloedlichaampjes als met cavianiersuspensie behandelde konijnen, werden daartoe op verschillende tijdstippen op drie wijzen getitreerd en wel volgens Forssman, volgens Shorb en Bailey en volgens de in het Centraal Laboratorium gebruikelijke werkwijze.

De methodes luiden als volgt:

Forssman werkt met 1 ccm 5% schapebloedlichaampjes onder toevoeging van 0.1 ccm onverdund caviaserum als complement. Dit caviaserum mag in deze dosis zelf geen spoor van haemolysine toonen. De proef wordt na 1 uur verblijf bij 37° C. (broedstoof of waterbad?) afgelezen.

Shorb en *Bailey* verstaan onder een haemolytische eenheid, die hoeveelheid serum, die in één uur bij 37° C. nog juist 0.5 ccm van een 2% schapebloedlichaampjes-suspensie haemolyseert. Als complement werd 0.2 ccm van een tienvoudig verdund versch caviaserum gebruikt. De totale hoeveelheid vloeistof in elke buis bedroeg 2 ccm.

In het *Centraal Laboratorium* wordt van den amboceptor een passende verdunning gemaakt; die sera, welke voor de proef van Wassermann moeten dienen, verdunt men vierhonderdvoudig.

Van deze amboceptorverdunning brengt men in een zestal buisjes dalende hoeveelheden en wel van 0.5 tot 0.05 ccm. De buizen worden met physiologische zoutoplossing tot 1.5 ccm bijgevuld, daarna worden 0.5 ccm 5% schapebloedlichaampjes-suspensie en 0.5 ccm 10% versch caviaserum toegevoegd. De proef wordt afgelezen, nadat de buizen ½ uur in de broedstoof van 37° C zijn gehouden.

Tabel I geeft de uitkomsten weer, die met een bepaald serum (nr. 880) werden bereikt. De minimale haemolyseerende

TABEL I.

Datum	MHD volg. Forssman tusschen	MHD volg. Shorb en Bailey tusschen	MHD Centr. Lab. tusschen
30. IV	0,0010 en 0,00050	0,00038 en 0,00025	0,0010 en 0,00050
1. V	> 0,0013	0,00063 en 0,00050	0,0023 en 0,0020
2. V	> 0,0040	0,00075 en 0,00063	0,0020 en 0,0015
3. V	0,0040 en 0,0030	0,0010 en 0,00075	0,0030 en 0,0020
4. V	0,0020 en 0,0010	0,00050 en 0,00025	0,0020 en 0,0010
18. VII	0,0030 en 0,0020	< 0,00025	0,0020 en 0,0010
19. VII	0,0020 en 0,0010	< 0,00025	< 0,0010
20. VII	0,0030 en 0,0025	0,00063 en 0,00050	> 0,0025
24. VII	0,0020 en 0,0015	< 0,00038	0,0020 en 0,0015
25. VII	0,0020 en 0,0015	0,00038 en 0,00025	0,0020 en 0,0015

doses zijn in ccm uitgedrukt. Het cavianierserum gedroeg zich in beginsel op dezelfde wijze. Uit deze minimale haemolysee-

rende doses laat zich de titer berekenen, d.i. het aantal M.H.D. per cc serum.

De verhouding tusschen de titers volgens Forssman eenerzijds en de beide andere methoden anderzijds geeft tabel II;

TABEL II.

Serum	Shorb en Bailey	Centr. Lab.
880	2,4	1
"	3,8	1,4
"	3,9	1
"	> 10	1,7
"	6,0	> 1,5
"	5,0	1,1
"	> 4,6	1
"	5,4	1
342	4,2	1,5
"	4,8	1,7
"	4,7	1,8
"	7,9	2,3
"	5,0	1,6
"	5,1	1
"	4,8	1
"	6,2	1,8

de hierin opgesomde cijfers zijn de quotienten verkregen door de titers volgens Shorb en Bailey en volgens de methode C.L. te deelen door die van Forssman. Daar waar de grenzen, waarbinnen de M.H.D. ligt wijd zijn (bijv. tusschen 0.0010 en 0.00050) is de berekende titer natuurlijk ook slechts ruw benaderd.

Vergelijkt men nu de uitkomsten, dan treft het groote verschil in titer, van op verschillende dagen verrichte bepalingen. In den beginne werkte ik met precisiepipetten, maatkolven enz. maar alras bemerkte ik, dat de fouten, die men zodoende tracht te omzeilen, in het niet verzinken bij die, welke aan de methodes als zoodanig kleven.

Het stelsel verdund haemolyseerend konijneserum, verdund caviaserum, suspensie van schapebloedlichaampjes en zoutsolutie bevat als eenig bekend bestanddeel de zoutoplossing. Hiermede, met het van cavia tot cavia wisselend „complement” en met bloedlichaampjes van *verschillende* schapen moet men trachten de waarde van den „amboceptor” te bepalen. De

invloed van het wisselend caviaserum tracht men wel te compenseeren door een overmaat te gebruiken, maar deze oplossing blijkt niet afdoende te zijn.

Om den invloed van complement en schapebloedlichaampjes afzonderlijk na te kunnen gaan, heb ik éénzelfde serum met dezelfde schapebloedlichaampjes getitreerd met verschillende caviasera en omgekeerd met één mengsel caviasera en erythrocyten van verschillende schapen. De tabellen II en III geven de uitkomsten weer.

TABEL III.

Caviaserum	7. V.	8. V.	9. V.
1	0,0030—0,0025	0,0025—0,0020	0,0035—0,0030
2	0,0025—0,0020	> 0,0040	0,0035—0,0030
3	0,0025—0,0020	> 0,0040	
4	0,0025—0,0020		
5	0,0020—0,0015		
mengsel	0,0030—0,0025	> 0,0040	0,0035—0,0030

TABEL IV.

Nr. schaap	MHD ligt tusschen
24	> 0,0080
25	0,0050 en 0,0040
27	0,0050 en 0,0040
31	0,0060 en 0,0050
33	0,0070 en 0,0060
36	> 0,0080
39	> 0,0080
41	0,0080 en 0,0070

Dit alles is „bekend”, d.w.z. in de gebruikelijke handboeken kan men eenige opmerkingen lezen over den invloed, die complement en schapebloedlichaampjes kunnen hebben op de hoogte van den titer. In de praktijk wordt er echter zelden rekening mede gehouden. In wezen is het niet anders gesteld met de „titers”, die we onze agglutineerende sera toekennen; ook deze gelden maar ten opzichte van één bepaalde bacteriesuspensie. Een behoorlijke titratie is in beide gevallen alleen mogelijk als men het te onderzoeken serum kan vergelijken met

een standaardserum. Van de gebruikelijke titerbepalingen mag men niet meer dan een indruk verwachten of een bepaald konijneserum al dan niet bruikbaar zal zijn als amboceptor in de reactie van Wassermann¹⁾.

Uit niets blijkt, dat de auteurs die zich met het F-antigeen bezig hielden, hunne sera anders dan op deze min of meer huis-houdelijke manier titreerden en het komt me dan ook niet on-waarschijnlijk voor dat hieraan de tegenspraak te wijten is, die er bestaat tusschen Forssman en Jijima over het gehalte aan haemolysinen van normale konijnesera. Forssman heeft dit bij een aantal dieren op verschillende tijdstippen bepaald en kwam tot de slotsom, dat de haemolytische titer bij één konijn van dag tot dag kon wisselen. Jijima bewaarde de porties serum, die hij achtereenvolgens aan een konijn ontnam in de ijskast en titreerde ze tegelijk met eenzelfde complement en eenzelfde erythrocytensuspensie. Zijn bevinding is dat het gehalte aan haemolysinen vrijwel constant is.

Techniek der Haemolysinenbinding.

Om na te gaan of de haemolysinen aan een bepaalde orgaan- of bacteriesuspensie worden gebonden, brengt men serum en suspensie samen, laat deze eenigen tijd (gewoonlijk één uur zij 37 ° C) op elkander inwerken, centrifugeert en gaat na of en zoo ja, in welke verdunning de bovenstaande vloeistof in samenwerking met een overmaat complement nog schapebloed-lichaampjes haemolyseert.

De talrijke variaties op dit eenvoudige thema kan men in twee groepen verdeelen:

1. die, waarbij complement en schapebloed *tegelijktijd* aan de bovenstaande vloeistof worden toegevoegd en
2. die waarbij men de schapebloedlichaampjes „sensibiliseert” met de bovenstaande vloeistof, centrifugeert, de bloedcellen suspendeert in een bepaalde hoeveelheid zoutoplossing en eerst daarna het complement toevoegt (Fujita).

¹⁾ Wanneer in den vervolge korthedshalve van „minimale haemolyseerende dosis” wordt gesproken, wordt hiermede niet een absolute waarde bedoeld, maar die hoeveelheid, die op dien bepaalden dag met het toen gebruikte complement en schapebloed nog juist volkomen haemolyse bewerkte.

Bij bacteriesuspensies behoeft het bovendien niet onverschillig te zijn of men met een suspensie, bereid door een agarkweek met zoutoplossing af te schudden, met gewassen bacteriën of met centrifugaten van bouilloncultures werkt. Al probeerende ben ik tot een werkwijze gekomen, die hoewel ze niet ideaal is, bevredigende uitkomsten oplevert.

Aanvankelijk bracht ik een suspensie van een agarkweek samen met verdunnen „amboceptor”, liet het mengsel 1 uur bij 37° C, centrifugeerde 1—2 uur en vergeleek de bovenstaande vloeistof met dezelfde serumverdunding, waaraan in plaats van de bacteriesuspensie een daaraan gelijke hoeveelheid fysiologische zoutoplossing was toegevoegd. De serumverdundingen werden hierbij onmiddellijk gemengd met complement en erythrocyten. De haemolyse door het serum van een konijn, dat herhaaldelijk met een cavia-suspensie was ingespoten, werd op deze wijze geremd, niet alleen door paratyphus-B-bacteriën, maar ook door typhus en zelfs door colibacillen, waarin nog niemand heterogenetisch antigeen heeft kunnen aantoonen en die dan ook in de „konijnreeks” zijn ondergebracht. Centrifugeerde men een dergelijke suspensie gedurende één uur en bracht men de bovenstaande vloeistof samen met het heterogenetische serum dan bereikte met hetzelfde resultaat. Gesedimenteerde en daarna gewassen bacteriën uit zulke suspensies leverden echter een geheel andere uitkomst; noch pty-B, noch ty- of colibacteriën remden de haemolyse. Het lag voor de hand om te veronderstellen dat men zodoende géén haemolysinenbinding aantoonde, maar de gevolgen van een „anticomplementaire” werking, hetgeen als volgt kon worden bewezen.

Zooals reeds is opgemerkt, bevat een homologe „amboceptor” naast haemolysinen van het heterogenetische type, zulke, die in tegenstelling tot de heterogenetische, een groepsreactie ten opzichte van *runder*bloedlichaampjes toonen.

Onder de voorradige „amboceptoren” voor de reactie van Wasserman werd één uitgezocht, die nog in sterke verdunding *runder*bloedlichaampjes haemolyseerde. Colibacteriën zijn er nog door niemand van verdacht F-antigeen te bezitten. Nu bleek een suspensie van colibacteriën de haemolyse van *runder*bloedlichaampjes door dezen homologen amboceptor te remmen: hiermede mag een haemolysinenbinding wel als uitgesloten worden beschouwd.

Het is mogelijk, dat deze „anticomplementaire” werking zich minder sterk laat gelden bij andere titratie-methodes waarbij bijv. de buizen langeren tijd in het waterbad worden gehouden; vrij zeker heeft ze echter Hans Schmidt 12) tot de meening gebracht, dat heterogenetische haemolysinen zeer labiele lichamen zouden zijn, die door suspensies van allerhande micro-organismen, bijv. staphylococcen gebonden zouden worden.

Gewasschen bacteriën toonen deze werking niet. Men werkt dan alleen met die bacteriën, welke het gemakkelijkst kunnen worden neergeslagen. Het is denkbaar, dat juist hetgeen na het centrifugeeren in suspensie blijft, bijzonder werkzaam is. Daarom paste ik de door Fujita aangegeven methode d.w.z. het complement werd toegevoegd aan de gesensibiliseerde bloedlichaampjes. Mary Shaw Shorb en Bailey centrifugeerden de buisjes niet na de sensibiliseering maar lieten de bloedlichaampjes tot den volgenden dag in de ijskast bezinken. Sommige bacteriesoorten veroorzaken in dien tijd een lichte haemolyse die, volgens de auteurs, vermeden wordt als men de suspensie vóór de proef even opkookt. Ik heb dezen ingreep, die mogelijkerwijze ongewenschte veranderingen van het antigeen tengevolge zou kunnen hebben, liever nagelaten en me de moeite van het centrifugeeren getroost.

Een twintigtal bindingsproeven werden op deze wijze met bevredigend resultaat uitgevoerd. Bij het nagaan van den invloed, die een willekeurig agglutineerend stelsel, met name een mengsel van typhusserum en typhusbacteriën, op de haemolysinen van een ptyB-serum heeft, nam ik echter een niet te verwaarloozen remming waar, die geheel of althans grootendeels opgeheven werd, als de bloedlichaampjes, na sensibiliseering, nog eens in 1 ccm zoutsolutie werden gewasschen. Dit wasschen paste ik regelmatig toe en alle bindingsproeven, die met ongewasschen bloedlichaampjes waren genomen, werden nog eens met de verbeterde techniek herhaald.

Deze luidt dan als volgt:

1. Voeg bij het verdunde serum de te onderzoeken bacteriesuspensie en houd het mengsel gedurende 1 uur in de broedstoof van 37° C.

2. Centrifugeer gedurende ½ uur bij ca. 3500 toeren.

3. Breng dalende hoeveelheden (0.5 tot 0.05 ccm) van de

bovenstaande vloeistof in een reeks buizen. Vul met zoutsolutie aan tot 0.5 ccm en voeg daarna 0.5 ccm van een 5% suspensie van schapebloedlichaampjes toe. Houd het rek met deze buizen $\frac{1}{2}$ uur bij 37° C.

4. Centrifugeer de buizen ongeveer 5 min. bij pl.m. 2000 toeren.

5. Giet de bovenstaande vloeistof af en vervang ze door 1 ccm zoutsolutie.

6. de inhoud der buizen wordt nu krachtig opgeschud en daarna weer 5 min. bij ± 2000 toeren gedraaid.

7. De bovenstaande vloeistof wordt afgegoten en aan de gesedimenteerde bloedlichaampjes 2 ccm zoutsolutie en 0.5 ccm 10% complement toegevoegd (contrôlebuis : 2.5 ccm zoutsolutie, géén complement).

Zorgvuldig opschudden!

8. Het rek wordt voor $\frac{1}{2}$ uur in de broedstoof van 37° C geplaatst en daarna het resultaat afgelezen.

Ter vergelijking wordt een zelfde serumverdunding niet met bacteriesuspensie, maar met een daaraan gelijke hoeveelheid zoutsolutie gemengd en dit mengsel wordt op precies dezelfde wijze gehanteerd als het serumbacteriesuspensiemengsel. Zodoende maakt men zich geheel onafhankelijk van den z.g. titer van het serum, maar bepaalt welke hoeveelheden verzadigd en onverzadigd serum met het complement en de bloedlichaampjes „van den dag” nog juist volkomen haemolyse bewerken. Vergelijking dezer twee waarden leert of de bacteriën al dan niet haemolysinen hebben gebonden.

Het aantal bacteriën, dat bij het verdunde serum werd gevoegd, werd niet nauwkeurig bepaald; steeds werden drie deelen van een ongeveer melkwitte suspensie gevoegd bij één deel verdund serum. Met 2 voorbeelden moge het voorafgaande worden toegelicht.

a. Van het serum van konijn 342, behandeld met caviarsuspensie, wordt 1 ccm (1 : 25 verdund) gemengd met 3 ccm ptyB-Schotmüllersuspensie. Als contrôle dient een mengsel van 1 ccm 342 (1 : 25) en 3 ccm zoutsolutie. Nadat deze mengsels de boven aangegeven bewerkingen hebben ondergaan, werden de volgende uitkomsten afgelezen (+ = volkomen haemolyse, \pm gedeeltelijke haemolyse, — volkomen remming)

	342 + pty B	342
	1 : 100	1 : 100
0.50	+	+
0.40	+	+
0.25	+	+
0.20	+	+
0.10	±	± (bijna volkomen!)
0.05	±	±

Gevolgtrekking: paratyphus-B-bacteriën binden de haemolysinen uit een heterogenetischen „amboceptor” met cavianiersuspensie bereid, *niet*.

b. Serum van konijn 536, behandeld met een suspensie van Schotmüllerbacteriën, wordt als volgt gemengd met paratyphus-B-bacteriën.

- 0.4 ccm serum + 0.6 ccm zoutsolutie + 3.0 ccm ptyB-bact.
- 1.0 ccm serum + 3.0 ccm ptyB-bact.
- contrôle : 0.4 ccm serum + 3.6 ccm zoutsolutie.

	536 + pty B	536 + pty B	536
	1 : 10	1 : 4	1 : 10
0.50	—	—	+
0.40	—	—	+
0.25	—	—	+
0.20	—	—	+
0.10	—	—	±
0.05	—	—	±

Paratyphus-B-bacteriën binden dus practisch alle heterogenetische haemolysinen uit een pty-B-serum.

Bereiding der heterogenetische amboceptoren.

Cavianier. Zoowel om de klassieke proef van Forssman te herhalen als om het serum met verschillende bacteriesuspensies te behandelen, werd een konijn geïmmuniseerd met een suspensie van cavianieren. Twee nieren werden zorgvuldig verwreven met zoutsolutie, daarna werd deze brei door dubbel doek gefiltreerd en met zoutsolutie tot 75 cm aangevuld. Als conserveermiddel werd 0.5% carbol toegevoegd. Gedurende het verblijf in de ijskast zakte een neerslag uit. Konijn 342 werd met de bovenstaande vloeistof intraveneus ingespoten en wel op

19	3	'34	met	1	ccm
22	3	'34	„	2	„
25	3	'34	„	3	„
29	3	'34	„	3	„
3	4	'34	„	3	„

Bij een proefpunctie op 6 4-'34 werd de minimale haemolyseerende dosis bepaald op 0.00025 ccm (vóór de behandeling gaf 0.10 ccm onvolkomen haemolyse!) Het serum werd op de gebruikelijke wijze gewonnen en na toevoeging van 0.5% carbol in de ijskast bewaard ²⁾).

Paratyphus B-bacteriën (type Schotmüller).

Omdat Eisler en Jacobsohn 13) ervoeren, dat zelfs opeenvolgende overzettingen van eenzelfde stam zich in de bindingsproef verschillend gedroegen en men dus a fortiori mag verwachten, dat verschillende stammen niet dezelfde antigene werking hebben, werd een polyvalente entstof bereid uit tien pty-B-stammen, alle in het Instituut uit patiëntenmateriaal gekweekt.

De bacteriën werden in het waterbad van 60° gedood en zonder conserveermiddel in de ijskast bewaard. De sterkte der suspensie bedroeg 1.5 milliard kiemen per ccm.

De konijnen 536, 537, 538 en 539 werden als volgt behandeld:

25	4.	0.5	ccm	intraveneus
2	5.	0.5	„	„
8	5.	0.5	„	„
14	5.	0.5	„	„
22	5.	0.5	„	„
30	5.	0.5	„	„

Proefpuncties werden verricht op 8-5, 14-5 en 28-5. (Tabel V).

Aan konijn 526 werd in het tijdperk tusschen 16-5 en 18-6 vijfmaal bloed ontnomen en het serum, na toevoeging van 0.5% carbol in de ijskast bewaard. Het laatst ontnomen serum bleek onbruikbaar te zijn; de haemolytische werking was te gering.

²⁾ Dit serum heeft vele malen goede diensten bewezen als „amboceptor” voor de reactie van Wassermann.

TABEL V.

Nr. konijn	8. V.	14. V.	28. V.
536	0,0075	0,0030	0,0030
537	> 0,050	0,040	> 0,050
538	> 0,050	> 0,050	> 0,050
539	> 0,050	> 0,050	> 0,050

Een intraveneuze injectie van 1 ccm bacteriesuspensie op 18-6 bracht hierin geen verbetering.

Konijn 536 wierp op 29-5 4 jongen, waarvan één spoedig stierf. Bij de drie overige werd den 28-6 proefpunctie verricht. Hiermede werden de sera van drie ongeveer even oude jongen van een onbehandeld konijn vergeleken. Geen dezer zes sera haemolyseerden in een dosis van 0.050 ccm. Zeer duidelijk verschilden ze echter in de agglutinatieproef met pty B-Ficker.

jong van konijn 536 (1): + 1/400

jong van konijn 536 (2): + 1/200; ± 1/400

jong van konijn 536 (3): + 1/400

controle (1) —

„ (2) —

„ (3) —

Op een dergelijke wijze werden de konijnen 157 en 158 met pty-B-bacteriën geïmmuniseerd:

17 7. 0.5 ccm intraveneus

20 7. 1.0 „ „

24 7. 1.5 „ „

Proefpunctie op 30-7 : M.H.D. 157 : 0.015 ccm

158 : 0.033 ccm

Het serum van 157 werd zonder conserveermiddel in de vrieskast (— 10° C) bewaard.

Gaertner-bacteriën.

Vier konijnen werden behandeld met een polyvalente entstof, die 9 stammen (alle Gaertner—Kiel) in den loop der jaren bij het routine-onderzoek verzameld en bovendien een Gaertner—Jenastam uit het Instituut „Robert Koch” bevatte; het kiemgetal bedroeg 2.5 miljard per ccm.

Aangezien het intraveneus inspuiten van een doode Gaertner-suspensie voor konijnen geen onschuldige ingreep is, ging hieraan een onderhuidsche inspuiting van 0.5 vooraf:

15	6.	0.5	ccm	subcutaan
19	6.	0.5	ccm	intraveneus
27	6.	0.5	„	„
4	7.	1.0	„	„
11	7.	1.0	„	„

Op 10-7 en 17-7 was de M.D.H. van deze sera grooter dan 0.050 ccm.

Suipestiferbacteriën.

De ervaring leert, dat het immuniseeren van konijnen met supistiferbacteriën nog vaker het dan inspuiten van Gaertner- en Aertryckesuspensies tot den ontijdigen dood der proefdieren voert.

Het bereiden van een agglutineerend serum voor deze giftige micro-organismen gelukt nog het best met inspuitingen van met formaline gedooide bouillonculturen. Voor het onderzoek naar de aanwezigheid van F-antigeen kwam mij echter het gebruik van bij 60° C gedooide suspensies juister voor.

Drie konijnen werden behandeld met een vaccin, dat uit vier suipestiferstammen type Kunzendorf (= West-Europeesch type der Engelschen) en één Amerikaansche stam bestond en wel:

29	7.	0.5	ccm	subcutaan
5	9.	1	„	„
13	9.	0.5	„	intraveneus
20	9.	1	„	„

Den 23-9 stierf een der dieren.

Den 27-9 1 ccm intraveneus.

Proefpunctie op 3-10 : M.H.D. > 0.050 ccm. Den 4-10 volgde een intraveneuze injectie van levende bacteriën n.l. 1 ccm van een suspensie, verkregen door 1 oogje cultuur in 10 ccm zoutsolutie te verwrijven.

Den 7-10 stierven beide dieren.

Een nieuw drietal konijnen werd op een dergelijke wijze geïmmuniseerd.

24	10.	0.5	ccm subcutaan
1	11.	1	„ „
8	11.	0.25	„ intraveneus
12	11.	0.50	„ „
17	11.	1	„ „

Proefpunctie op 26-11 : M.H.D. > 0.050 ccm.

27 10. 2 ccm intraveneus

Proefpunctie op 3-12 : M.H.D. > 0.050 ccm.

Met de op 26-11 gewonnen sera en homologe suspensie werd een agglutinatieproef verricht; één serum agglutineerde nog in een verdunning: 1 : 25600; de beide andere in een verdunning van 1 : 6400.

Ook als men overtuigd is van de betrekkelijke waarde, die aan het titreeren van haemolyseerende amboceptoren mag worden toegekend, is de gevolgtrekking dat het met cavianiersuspensie en met *ptyB* (Schottmüller)bacteriën gelukt is om een belangrijke stijging der haemolysinen te bereiken, niet gewaagd.

Suipestifer- en Gaertnerbacteriën bleken in dit opzicht onwerkzaam te zijn. De proefdierenreeks is te klein om met zekerheid de aanwezigheid van F-antigeen te kunnen uitsluiten, temeer omdat wij in deze zelfde periode bij de bereiding van Wassermann-amboceptor, al heel weinig geluk hadden. Voorzover ze het bacterium enteritidis Gaertner betreffen, komen de uitkomsten wel overeen met de algemeene ervaring.

Met suipestiferbacteriën is veel minder vaak gewerkt. Het zou ook zeker de moeite loonen om met minder giftige vertegenwoordigers der *Pty-C*groep konijnen te immuniseeren.

Uitkomsten der haemolysinenbindingsproeven.

a. Cavianierserum. De techniek dezer proef is in het voorafgaande uitvoerig beschreven; met een weergave van de uitkomsten in tabelvorm kan dus gevoegelijk worden volstaan.

Alle proeven werden minstens tweemaal verricht, kortheidshalve wordt er slechts één vermeld (tabel VI).

De cavianiersuspensie bij deze proeven gebruikt werd telkens versch bereid; een conserveermiddel werd er niet aan toegevoegd. De bacteriesuspensies werden tevoren één uur bij 60° C verhit.

TABEL VI.

MHD onbehandeld serum	Serum 342 behandeld met	MHD behandeld serum	Haemolys. binding in %
< 0,00050	cavianiersusp.	0,015	97
0,00075	bact. pty. B verhit op 60°	0,00080	0
0,00075	" " " " 100°	0,00080	0
0,00075	" " beh. met formaline	0,00075	0
0,00088	" dys. Shiga (60°)	0,00038	0

Met geen der onderzochte bacteriesuspensies gelukte het om haemolysinen te binden, ook niet met Shiga-Kruse-bacillen, waarmede Jijima in tegenstelling met Fujita e.a. positieve uitkomsten gekregen zou hebben.

b. Paratyphus-B-serum. Hiertoe stonden 2 sera n.l. 536 en 157 ter beschikking.

De resultaten van deze proeven, voorzooverre ze ondubbelzinnige uitkomsten gaven, vindt men in tabel VII samengevat.

TABEL VII.

Nr. serum	MHD onbehandeld serum	Behandeld met	MHD behandeld serum	Haemolysine-binding in %
536	0,015	pty B-Schottmüller	> 0,13	> 88
"	0,023	" " (100°)	0,057	58
"	0,045	Aertrycke	> 0,13	> 65
"	0,045	" " (100°)	> 0,13	> 65
"	0,045	Gaertner	0,045	0
"	0,027	Suipestifer	0,027	0
"	0,023	Typhus	0,015	0
"	0,030	Cavianier	0,23	87
157	0,045	pty B-Schottmüller	> 0,13	> 65
"	0,045	" levend gewasschen	0,083	50
"	0,033	" formaline	0,11	70
"	0,015	Stanley (NCTC)	0,13	88
"	0,033	Coli (stam „Ovens")	0,038	0
"	0,033	" (stam „Stickland")	0,038	0
"	0,033	Thompson (stam „Sittard")	0,038	0
"	0,033	Berlijn (stam „Dr. Julius")	0,038	0
"	0,033	Virchow (Inst. „R. Koch")	0,038	0
"	0,033	Orient („Deli suipestifer")	0,038	0
"	0,033	Orient („ptyC. Neukirch")	0,038	0

We zien dus het merkwaardige verschijnsel, dat de haemolysinen uitsluitend worden gebonden door cavianiersuspensie, het homologe type, én door Aertrycke- en Stanleybacteriën, behoorend tot de B-groep van Fritz Kauffmann. Noch Gaertnerbacteriën, noch een der vele vertegenwoordigers van de C-groep (suipestiferstammen van het Europeesch, Amerikaansch of Oostersche type, „Virchow”, „Thompson-Berlyn”) waren hiertoe in staat.

Het antigeen, waarop Kauffmann zijn indeeling grondde, is het thermo-stabiele O-antigeen. Inderdaad blijken ook in deze proeven gekookte Schottmüller en Aertryckesuspensie werkzaam te zijn, zij het ook niet zoo krachtig als de op 60° C verhitte. In tegenstelling met mijn verwachting bonden met formaline behandelde Schottmüllerbacteriën F-haemolysinen. De suspensie werd bereid door de bacteriën te centrifugeeren uit een als Fickers reagens gebruikte bouilloncultuur, waaraan 1% handelsformaline was toegevoegd, daarna tweemaal in physiologische zoutoplossing te wasschen en hierin te suspendeeren. Dr. J. Reith was zoo vriendelijk het formalinegehalte van het tweede waschwater voor mij te bepalen; dit bedroeg $\pm 0.0004\%$. De suspensie bevatte dus practisch geen vrij formaline meer.

Met een dergelijke „formaline-Ficker” kan men uitsluitend een grofvlokkige „H”-agglutinatie aantoonen. Voor het aantoonen van „O”-agglutinenen moet men of een levende kweek of een „alcohol-Ficker” gebruiken.

Is dit niet een argument tegen de identiteit van „O” en „F”-antigeen? Men zou geneigd zijn deze vraag bevestigend te beantwoorden.

Ibrahim en Schütze (1928) 14) toonden aan, dat het werkzame bestanddeel van typhus- en paratyphusvaccins het „O”-antigeen van de „S”-form is. Greenwood, Topley en Wilson (1931) hebben op groote schaal muizen met *formaline*-vaccins behandeld en daarna met bact. Aertrycke geïnfecteerd. Al die vaccins, welke uit bacteriën waren bereid, die het „O”-antigeen van de B-groep bezitten, verhoogden duidelijk den weerstand der proefdieren. De immuniseerende werking blijft dus behouden ondanks de formaline; dat met formaline behandelde bacteriën F-haemolysinen binden, behoeft m.i. dan ook nog niet tegen de meening van Kurt Meyer te pleiten.

Niet altijd waren de uitkomsten even ondubbelzinnig, met name niet van die, welke werden uitgevoerd met drie Newport-stammen en met een „Derby”- en een „Reading”-stam, de beide laatste uit de National Collection of Typecultures te Londen. *Nu en dan* werden, in vergelijking met het onbehandelde serum *lichte* remmingen der haemolyse waargenomen. Voor deze bindingsproeven werd het betrekkelijk zwak haemolyseerende serum 157 gebruikt, waarbij ondanks de gevolgde bindings-techniek nu en dan last van een anticomplementaire werking werd ondervonden.

De proeven werden daarom herhaald; naast onbehandeld serum werd met colibacteriën behandeld serum getitreerd. De *Salmonellae* „Reading” en „Derby” remden niet sterker dan colibacteriën; het mengsel van drie „Newport”-stammen remde *sterker* dan colibacteriën.

In tegenstelling dus tot de types „Schottmüller”, „Aert-rycke” en „Stanley” gaven de eveneens tot de B-groep behorende „Derby” en „Reading”-stammen negatieve of twijfel-achtige uitkomsten; raadpleegt men de analyses der „O”-receptoren van de verschillende vertegenwoordigers der B-groep, zooals deze door Bruce White en Kauffmann zijn opgesteld, dan blijken de factoren, waaruit het „O”-antigeen van de „Schottmüller”-, „Aerttrycke”- en „Stanley”-types zijn opgebouwd, *volkomen* aan elkander gelijk te zijn, die van „Derby” en „Reading” zijn onderling gelijk, maar wijken af van het eerstgenoemde drietal.

De analyse van het „O”-antigeen van het „Newport”-type is een der weinige punten, waarin de schemata van Bruce White en Kauffmann niet onbelangrijk verschillen. Derden hebben afwijkingen gevonden zowel van Bruce White’s als van

TABEL VIII.

Bruce White			Salmonellatype	Fritz Kauffmann		
„O”	„H-groep”	„H-spec.”		„O”	„H-groep”	„H-spec.”
I, II, 7, 8	G, A	p tyB-spec.	Schottmüller	IV, V	1, 2	b
I, II, 7, 8	G, A, B, C	Aertr. spec.	Aerttrycke	IV, V	1, 2, 3	i
I, II, 7, 8	G, A	S	Stanley	IV, V	1, 2	d
II, 7, 8	G, B, E	D	Reading	IV	1, 4, 5	e, h
II, 7, 8		R Q	Derby	IV		f, g
IV, VI, 7	G, A, B, C	D	Newport	VI, VIII	1, 2, 3, 4	e, h

Kauffmann's opgaven. Clauberg 15) en Topley 16) en ook schrijver dezes 17) vonden een vrij sterke fijnkorrelige agglutinatie in „Aertrycke” serum. Geen van beide receptoren-analyses geeft hiervoor een voldoende verklaring, tenzij men aanneemt, dat de bijkomstige factor „7” van Bruce White zich bij sommige stammen hinderlijk op den voorgrond heeft gedrongen.

De uitkomsten der bindingsproeven kunnen als volgt worden samengesteld. De F-haemolysinen uit een caviaserum werden gebonden door cavianiersuspensie, maar niet door F-antigeen bevattende bacteriesuspensies.

De F-haemolysinen uit „Schottmüller” sera werden gebonden door cavianier, door het homologe Salmonellatype en door bacteriën, wier „O”-antigeen daarmee volkomen overeenstemt.

Bacteriën met een verwant, maar niet volkomen gelijk „O”-antigeen gaven twijfelachtige uitkomsten evenals het type „Newport”, waarbij de analyses van het „O”-antigeen tot tegenstrijdige uitkomsten voerden.

Bovendien werd aangetoond, dat met formaline behandelde en daarna gewasschen „Schottmüller”-bacteriën even goed bonden als op 60° C verhitte of gekookte.

Geen dezer bevindingen is in tegenspraak met de meening van Kurt Meyer, dat „O” en „F”-antigeen bij de Salmonellae met elkander identiek zouden zijn; een bevestiging van Meyer's uitkomsten zou slechts geleverd kunnen worden, indien het me gelukt ware, ook in Salmonellae uit de C- of uit de Gaertner-groep F-antigeen aan te toonen.

Nog even moge worden ingegaan op de eigenaardigheid van Forssman's haemolysinen om zich wel alle aan schapebloed-lichaampjes te binden, maar niet aan elk willekeurig F-antigeen; cavianierhaemolysinen worden niet gebonden door pty-B-of Shigabacteriën; pty-B-en Shigahaemolysinen wel door cavianiersuspensie. Men zou geneigd zijn dit aan de quantitative verhoudingen te wijten; de orgaansuspensies schijnen inderdaad veel gemakkelijker F-antilichamen op te wekken, een „sterker” antigeen te zijn dan bacteriën. Als, gelijk Kurt Meyer e.a. vonden, ook de bacterieele F-haemolysinen en antigeen elkander onderling niet altijd binden, gaat deze verklaring niet op.

Past men de bekende „sleutel en slot” vergelijking der fermenten en antilichamen op deze verschijnselen toe, dan komt men er toe om het schapebloedlichaampje te beschouwen als een minderwaardig slot, waarop tal van ongelijksoortige sleutels passen. Dit geeft evenmin een verklaring als de naam „areciproke” reacties, die men er aan gegeven heeft.

Met sommige kunstmatige complexe antigenen vond Landseiner 18) iets dergelijks : o-amino-benzoëzuur-immuunserum werkte even sterk op het homologe als op het o-amino-benzolsulfonzuurantigeen maar omgekeerd o-amino-benzolsulfonzuurserum *niet* op o-amino-benzoëzuurantigeen.

Voor den bacterioloog, die met goed gevolg de verzadigingsproef van Castellani verricht om uit te maken of twee bacteriestammen al dan niet serologisch identiek zijn, is het nuttig te bedenken, dat zijn star receptorenschema niet op alle antigenen of elke immuniteitsreactie toegepast kan worden.

Onderzoek van sera van paratyphuspatiënten.

De vraag of Forssman's antilichamen in het serum van paratyphuspatiënten voorkomen, is niet alleen van theoretisch belang. Men heeft haemolysinen en agglutininen voor schapebloedlichaampjes aangetoond bij den mensch, na inspuiting van paardenserum (Davidsohn). Het paard behoort tot de caviareeks, de mensch tot de konijnereeks; de vorming van F-antilichamen mocht dus à priori verwacht worden. Maar ook bij andere toestanden, met name bij die, welke als „lymphatische reactie bij acute infecties”, als „lymphocyten-angina”, „acute mononucleose” en „Pfeiffer's klierkoorts” worden aangeduid, kan het patiëntenserum schapebloedlichaampjes agglutineeren in hooger verdunningen dan dat van gezonden of lijders aan andere ziekten. Paul en Bunnell 19) vonden als eersten deze eigenaardigheid bij eenige patiënten, bij wie zij de diagnose op „acute mononucleose” stelden en hun vondst werd van verschillende zijden bevestigd. De vraag of alle boven opgesomde namen synoniemen zijn voor éénzelfde infectieziekte, die onder een wisselend klinisch beeld met of zonder angina verlopen kan, dan wel of men in wezen verschillende ziekten te maken heeft, wordt door de clinici niet eenstemmig beantwoord, hetgeen, zoolang men niet meer over de aetiologie en pathogenese weet, ook niet verwonderlijk is.

Rosenthal en Wenckebach 20) meenden, dat tusschen „acute mononucleose”, „lymphocytenangina” en „Pfeiffer's klierkoorts” wel degelijk onderscheiden moet worden; zij maakten zich van hun onderzoek naar de diagnostische waarde van de reactie van Paul en Bunnell wel heel gemakkelijk af door patiënten, die weliswaar klinisch aan „acute mononucleose” schenen te lijden, maar wier serum schapebloed-lichaampjes niet of zeer zwak agglutineerde, bij een der twee andere rubrieken onder te brengen. Geen wonder, dat ze dan eindelijk het vervlogen ideaal der serologen vervuld zagen: een specifieke reactie, die in 100% der gevallen positief uitvalt.

Hier te lande hebben Meyler en Siemerink 21) en Minkenhof 22) over positieve uitkomsten bericht bij Pfeiffer's klierkoorts resp. lymphatische angina; zij beschouwen de reactie als een aanwinst voor de klinische diagnostiek.

Onder de vele contrôleproeven van de verschillende auteurs komen er slechts enkele voor, die met sera van paratyphuslijders werden uitgevoerd. Het voorkomen van F-antigeen in paratyphus-B-bacteriën zou juist in deze sera F-antilichamen doen verwachten.

Ik heb daarom een aantal sera, ingezonden ter uitvoering van de reactie van Widal, welke een positieve uitkomst met paratyphus B-„ficker” gaven, op de aanwezigheid van F-antilichamen onderzocht en daarbij stipt de techniek die Paul en Bunnell mededeelden gevolgd. Latere onderzoekers hebben zich kleine afwijkingen van het oorspronkelijke voorschrift veroorloofd, hetgeen mij bij deze „jonge” reactie, die bovendien strikt quantitatief wordt gewaardeerd, ongewenscht voorkomt. Van het serum wordt een reeks verdunningen met zoutoplossing gemaakt en wel 1 : 4; 1 : 8; 1 : 16 enz. in een vloeistofvolumen van 0.5 ccm. Achtereenvolgens voegt men nog 1 ccm zoutoplossing en 1 ccm van een 2% suspensie van schapebloed-lichaampjes toe. Het reukje wordt gedurende één uur in een waterbad van 38° C gehouden en daarna tot den volgende dag in de ijskast bewaard.

Vóór de aflezing worden de buizen driemaal omgekeerd. Men duidt de serumverdunningen, hoewel ze feitelijk vijfmaal sterker zijn, aan met die, welke zij in de aanvankelijke halve ccm hadden; de graad eener positieve reactie wordt met drie, twee, één kruisje en met „±” aangegeven.

- [+++ = firm disk
 ++ = disk easily broken into large flakes
 + = fine agglutination
 ± = barely perceptible but definite agglutination]

TABEL IX.

Nr. serum	Aggl. titer	1 : 4	1 : 8	1 : 16
3030	> 500	—	—	—
3031	> 500	te weinig	serum	1 : 10—
3061	100	++	+	—
3094	> 500	+++	++	—
3265	> 500	++	+	—
3276	500	++	+	—
3278	> 500	te weinig	serum	1 : 10—
3285	> 500	++	+	—
3310	500	++	+	—
3343	> 500	+	—	—
3394	> 500	+	±	—
3503	> 3200	++	—	—
3534	250	+	±	—
3584	500	+	±	—
3613	250	++	—	—
3656	> 500	+	—	—

Diagnostische waarde kent men aan de reactie, toe indien ze in een verdunning van 1 : 16, volgens anderen 1 : 32, positief uitvalt. Gelijk men in tabel IX kan zien, voldoet aan dezen eisch geen der paratyphussera; een vermeerdering der F-antilichamen kon in deze sera dus niet worden aangetoond.

Samenvatting.

Forssman's antigeen werd aangetoond in paratyphus-B-bacteriën (Schottmüller), niet in Suïpestifer- en Gaertner-bacteriën. De haemolysinen in deze paratyphus-B-sera werden gebonden door cavianiersuspensie, het homologe Salmonella-type, door „Aertrycke”- en „Stanley”bacteriën. Salmonella-typen uit de C- en Gaertnergroepen waren hiertoe niet in staat. Gekookte suspensies van „Schottmüller”- en „Aertrycke”-bacteriën, met formaline behandelde „Schottmüller”-bacteriën gedroegen zich als bij 60° C gedooide suspensies.

De types „Reading”, „Derby” en „Newport” gaven twijfelachtige uitkomsten.

In sera van paratyphuslijders konden met de door Paul en Bunnell beschreven techniek geen agglutinenen voor schapebloedlichaampjes worden aangetoond.

De techniek der titerbepaling en van de haemolysinenbindingsproef werd uitvoerig besproken.

LITERATUUROPGAVE.

- 1) J. Forssman, *Biochem. Ztschr.* 37, 78, 1911.
Handbuch path. Mikroorgan. III, 1, 469, 1930.
- 2) K. Landsteiner, *Die Spezifität der serologischen Reaktionen*. Berlin 1933, p. 45.
- 3) Schiff u. Adelsberger, *Zbl. Bakt.* I, 93, 172, 1924.
- 4) A. Rothacker, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 16, 491, 1913.
- 5) K. Meyer, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 71, 331, 1931.
- 6) M. Eisler, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 73, 392, 1931-32.
- 7) W. Seiffert, *Zbl. Bakt.* 114, 285.
- 8) R. Tsuneoka, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 22, 567, 1914.
- 9) K. Fujita, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 43, 329, 1925. Ibidem 41, 539, 1924.
- 10) Jijima J. *Path. Bact.* 26, 519, 1923.
- 11) Mary Shaw Shorb a. G. Howard Bailey *Amer. J. of Hyg.* 19, 148, 1934.
- 12) H. Schmidt, *Ztschr. f. Immun.forsch.* 43, 422, 1925.
- 13) M. Eisler u. L. Jacobsohn *Z. Hyg. u. Inf. Krankh.* 115, 669, 1933.
- 14) Geciteerd naar W. W. C. Topley, *An outline of Immunity*, London 1933, 130.
- 15) Clauberg, *Zentr. bl. Bakt.* 1, 126, 49, 1932.
- 16) W. W. C. Topley, *The Principles of Bacteriology and Immunity*, I, London, 1929, 440.
- 17) A. W. Pot, *Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid*, April 1933.
- 18) K. Landsteiner, l.c. p. 97.
- 19) J. R. Paul and W. W. Bunnell, *Amer. J. Med. Sc.* 183, 90, 1932.
- 20) N. Rosenthal u. G. Wenckebach, *Kl. Wochenschr.* 13, 499, 1933.
- 21) L. Meyler en R. J. Siemelink, *Ned. T. v. Geneesk.* 1934, 1952-1959.
- 22) J. E. Minkenhof, *Ned. T. v. Geneesk.* 1934, 3656-3672.

Over den invloed van Röntgenstralen op het ontstaan van tuberculose na inspuiting van filtreerbaar tuberculose-virus

DOOR

Dr. J. VAN DER LEE,
Districts-tuberculosearts.

Ondanks de vele onderzoeken over het vraagstuk van de filtreerbaarheid van het tuberculose-virus zijn de meeningen nog steeds verdeeld. Op welke wijze dit vraagstuk ook wordt benaderd, telkens weer verschijnen er in de literatuur tegenovergestelde resultaten, zoodat eenerzijds talrijke onderzoekers, vnl. uit de Fransche school, het bestaan van een „ultravirus tuberculeux" bewezen achten, terwijl anderzijds even betrouwbare proefnemingen worden medegedeeld, waarin een geheel negatief resultaat is verkregen.

Zoolang de laboratoriumproeven nog zoo vele moeilijkheden geven, is het gewenscht zich zoo weinig mogelijk uit te laten over de beteekenis van dit ultravirus voor de kliniek van de tuberculose.

De toestand is op dit oogenblik nog zoo, dat men voor de pathologie van de tuberculose geen houvast heeft aan de medegedeelde positieve bevindingen en niet gerechtigd is gevolgtrekkingen te maken, welke veranderingen zouden kunnen brengen in onze opvattingen omtrent het ontstaan en de verbreiding van de tuberculose bij den mensch.

De door *Calmette*, *Arloing* en *Dufourt* naar voren gebrachte transplacentaire besmetting van het foetus zal voor de kliniek van de tuberculose eerst dan beteekenis krijgen als deze onderzoeken uitgebreid worden en meer standvastige resultaten geven.

¹⁾ Thans te Bilthoven.

Doch ook al meent men, dat na inspuiting van culturen van tuberkelbacillen of tuberculeus materiaal, bij de proefdieren een atypische tuberculose kan worden opgewekt, welke zich vnl. uit in een zwelling van de mesenteriale en tracheobronchiale lymphklieren met aanwezigheid van zuurvaste elementen, dan nog blijft het vraagstuk onopgelost, omdat de schakel tusschen atypische tuberculose en de klinische tuberculose, zooals wij die tot nog toe kennen, ontbreekt.

Wel is waar zijn er in de literatuur proeven medegedeeld, waarin na herhaalde dierpassage tenslotte typische tuberculose optrad, doch deze resultaten zijn meestal door andere onderzoekers niet bevestigd kunnen worden en kunnen niet worden herhaald zóó, dat ieder in staat is dezelfde bevindingen te verkrijgen. Er is nog geen methode aangegeven, welke ons in staat stelt met zekerheid positieve resultaten wat betreft het vinden van tuberkelbacillen uit organen van met filtraat ingespoten dieren te verkrijgen, zoodat zelfs ook onder de mededeelingen met positieven uitslag evengoed proefseries voorkomen, welke een geheel negatief resultaat geven.

Ook de opvatting omtrent den aard van het filtreerbaar tuberculosevirus heeft zich de laatste 10 jaren gewijzigd.

Fontès had met zijn filtratieproeven oorspronkelijk de bedoeling de *Much'sche* granula van het overige materiaal te scheiden en vond toen, dat deze korrels in staat waren atypische veranderingen bij de caviae te veroorzaken. Toen deze proeven door *Vaudremer* werden herhaald, gebeurde dit naar aanleiding van zijn onderzoekingen over het kweken van tuberkelbacillen op voedselarme synthetische voedingsbodems, waarbij het tuberculose-virus zich voordeed als ronde bolletjes, die stofklein konden zijn of iets groter.

Vaudremer meende, dat deze atypische al of niet zuurvaste elementen het waren, welke de filters passeerden, weer uit konden groeien tot typische tuberkelbacillen en bij de proefdieren atypische tuberculose konden geven (polymicroadenie, gewrichtszwellingen).

Calmette daarentegen meent, dat de atypische tuberculose na inspuiting van filtraat wordt veroorzaakt door een onzichtbaren vorm van het tuberculose-virus, een echt „ultravirus” dus, vnl. wel omdat in het centrifugaat van het filtraat nooit zichtbare elementen konden worden aangetoond. Zelfs is deze

hypothese op de kliniek van de tuberculose overgebracht op grond van de opvattingen van *Calmette* over de praebacillaire stadia der tuberculose, waarbij wordt aangenomen, dat er aan de ons bekende vormen en localisaties van de tuberculose één of meer stadia voorafgaan, veroorzaakt door dit „ultravirus”.

Worden er in het centrifugaat van het filtraat geen zichtbare elementen van het tuberculose-virus gevonden, dan is hiermede niet bewezen, dat ze er niet in voorkomen.

Men zal ze alleen dan vinden, wanneer er betrekkelijk veel in het filtraat aanwezig zijn; zijn het er weinige, dan zullen ze aan de waarneming moeten ontsnappen.

Dit is trouwens gemakkelijk te bewijzen uit vroegere mededeelingen over dit vraagstuk. In den beginne vonden sommige onderzoekers, dat uit het filtraat direct weer typische tuberkelbacillen kon worden gekweekt, terwijl toch nu wel vaststaat, dat dit niet het geval is. Het ligt dus voor de hand aan te nemen, dat bij deze positieve kweekproeven enkele bacillen den filter gepasseerd zijn, zonder dat in het centrifugaat bacillen konden worden aangetoond.

De onderzoekingen van *Kahn* en *Torrey*¹⁾ en van onze landgenoot *Dr. Broek*²⁾ hebben wel met zekerheid aangetoond, dat de opvatting, welke reeds door *Fontès* langen tijd was verdedigd, nl. dat de granulaire vormen van het tuberculose-virus van overwegende beteekenis zijn voor de ontwikkeling van den tuberkelbacil, juist is.

Welke granula nu mogelijk den filter passeeren (*Much*'sche granula, of zuurvaste korrels) is voor het vraagstuk van de filtreerbare vormen van het tuberculose-virus op het oogenblik nog bijkomstig, in zooverre als het hier alleen gaat om de grootte van de verschillende granula.

Zelfs weinige korrels kunnen een cultuur van typische tuberkelbacillen geven en wanneer ze in gering aantal den strijd moeten voeren tegen de verwekrachten van het dierlijk organisme kunnen ze misschien wel een matige ontwikkeling tot zuurvaste staafjes geven zonder echter in staat te zijn in het lichaam, althans zonder verdere overenting, direct waarneembare tuberculose te verwekken.

Dit alles maakt het dus gewenscht nog geen oordeel te

¹⁾ Kahn en Torrey. Am. Review of tuberc. T 18 pag. 815.

²⁾ Broek. Les granules du virus tuberculeux aviaire. Diss. Utr. 1931.

geven over wat den filter kan passeeren, afgezien nog van het filtratieproces zelve, dat door allerlei oorzaken geheel verschillende resultaten kan geven.

Principieel is eerst de vraag op te lossen: bestaat er een of andere vorm van het tuberculose-virus welke in staat is de gebruikelijke filters te passeeren en een of andere verandering in het dierlijk organisme te voorschijn te roepen? Welke vorm dit is komt eerst in tweede instantie aan de orde.

Zoolang de resultaten nog zoo uiteenloopen is het beter nog niet te spreken van een ultra-virus, daar nog niet met zekerheid is aangetoond, dat de beschreven atypische tuberculose niet door een anderen vorm van het tuberculose-virus die het filter passeert kan worden veroorzaakt.

Wie de preparaten van *Calmette* heeft gezien, zal moeten toegeven, dat er geen twijfel is, of de door hem gevonden zuurvaste elementen in de klieren van de met filtraat ingespoten caviae zijn typische tuberkelbacillen. Meestal liggen ze in een groepje bij elkaar, voor het grootste gedeelte zuurvast met enkele niet zuurvaste bacillen daartusschen.

Wanneer wij in een klieruitstrijkje soms eens een enkel zuurvast staafvormig element zien, is dit vrij wel zeker geen tuberkelbacil. Het vinden van een enkel zuurvast staafje zegt niets en is niet gelijk te stellen met de duidelijke resultaten in de preparaten van *Calmette* en zijn medewerkers.

De groote moeilijkheid van het onderzoek is vooral de pijnlijke nauwkeurigheid waarmede de preparaten moeten worden doorgezocht. Weinige preparaten vorderen reeds zoo veel tijd en geduld, dat het bijna ondoenlijk is alle uitstrijkjes voldoende te bezichtigen.

Het is daarom niet geraten een groote proefserie te beginnen, daar dan zeker de nauwkeurigheid er onder lijden moet.

Het eenvoudigste zou zijn, indien wij de met filtraat ingespoten proefdieren op een of andere manier zóó konden bewerken, dat het aantal zuurvaste bacillen in korten tijd belangrijk toeneemt of indien wij daardoor typische tuberculeuse afwijkingen konden doen ontstaan.

Van Deynse ³⁾ heeft kort geleden een methode aangegeven, waardoor het mogelijk is bij de met filtraat geënte caviae in

³⁾ F. van Deynse. Contribution à la mise en evidence rapide de l'ultra-virus tuberculeux. C.R.S.B. T 107, pag. 1058.

korten tijd een groot aantal zuurvaste staafjes te doen ontstaan, door de proefdieren te voren in te spuiten met een suspensie van geprecieerd calciumfosfaat.

Nègre en *Valtis* ⁴⁾ geven aan, dat het hun gelukt is typisch tuberculeuse veranderingen bij de met filtraat ingespoten caviae te voorschijn te roepen, indien zij de dieren eerst behandelden met een acetoneextract van tuberkelbacillen.

In de literatuur zijn door *Petragani* en *Flu* mededeelingen bekend gemaakt, waarbij met deze methoden een negatief resultaat werd verkregen. Het blijft dus nog onzeker, of er met filtraat typische tuberculose is op te wekken. Welk verband er bestaat tusschen de klinische tuberculose en de door filtraat te voorschijn gebrachte atypische veranderingen is dus zeker nog onbekend en zonder aan de waarde van het nauwkeurig onderzoek der Fransche school iets te willen afdoen, is het vraagstuk nog even moeilijk als toen de eerste resultaten door *Fontès*, *Vaudremer* en *Valtis* werden gepubliceerd.

Ook de onderzoekingen, welke het gevolg waren van de toepassing van de methode van *Löwenstein*, voor het kweken van tuberkelbacillen uit het bloed, hebben de schakel tusschen de microculturen en typische culturen van de tuberkelbacillen nog niet kunnen leggen.

Wel heeft men bij de met filtraat geënte caviae microculturen in de klieren kunnen aantoonen (*Ninni*), maar over de beteekenis van deze microculturen zijn de acten nog niet gesloten, evenmin als van deze culturen, bij het kweken van bloed op den voedingsbodem volgens *Löwenstein*, daar zij voor caviae niet virulent zijn en niet overgeënt kunnen worden.

De mogelijkheid om caviae overgevoelig te maken voor het tuberculose-virus leek mij niet uitgesloten, sinds gebleken was, dat deze dieren door voorbehandeling met röntgenstralen in korten tijd uitgebreide verkazende tuberculose kregen na inspuiting van tuberculeus materiaal ⁵⁾. Ik heb daarom getracht caviae door bestraling met röntgenstralen overgevoelig te maken voor het tuberculose-virus, met de gedachte, dat door

⁴⁾ L. Negre et J. Valtis. Action des extraits acétoniques de bacilles de Koch sur les propriétés pathogènes des éléments filtrables du virus tuberculeux. An. Inst. Past. T 64, pag. 587.

⁵⁾ Morton. Journ. of ex. Med. T. 24, pag. 419.

deze methode het filtreerbaar virus mogelijk beter zou aanslaan en duidelijker afwijkingen zou kunnen geven.

Techniek:

Voor het filteren werden nieuwe Chamberlandkaarsen L_2 en L_3 gebruikt. De filtratie geschiedde van buiten naar binnen. Aan het te filteren materiaal werd een cultuur van vogelcholera toegevoegd.

Het filtraat werd geënt op verschillende voedingsbodems. Alle culturen bleven steriel.

De bestralingen werden gedaan met condensatorgelijkspanning 160 K.V. 3m A. 0.5 Cu + 1 Al. De dosis werd gevarieerd door verandering in den duur der bestraling.

Van de bestraalde caviae werd vóór en na de bestraling het aantal leucocyten geteld; 2×24 uur was het aantal leucocyten gemiddeld tot de helft verminderd.

Een overzicht van de proeven is in de tabellen gegeven:

Proef 1.

4/8'31 wordt een cavia met röntgenstralen bestraald gedurende 20 minuten = 250 R.

10/8'31 cultuur van tuberkelbacillen (T.H.) op *Sauton* (14 dagen oud) wordt van de voedingsvloeistof ontdaan en het vlies, gemengd met 100 cc. steriele physiologische zoutoplossing geschud en na toevoeging van een cultuur vogelcholera gefiltreerd door L_2 en L_3 filter.

Het filtraat geënt op verschillende voedingsbodems bleef steriel.

11/8'31 de bestraalde cavia en 2 andere worden intraperitonaal geënt met 5 cc. van het filtraat.

13/8'31 bij alle drie caviae wordt buikpunctie gedaan.

In het preparaat van het exsudaat werden geen zuurvaste elementen gevonden.

De bestraalde cavia werd eenige uren na de punctie minder vlug, sleepte zich voort en stierf den zelfden avond.

Bij de sectie werden nergens vergrootte klieren gevonden, evenmin ontstekingshaarden. In de R. oksel een bloedstolsel; een groot haematoom op en onder het peritoneum. Bij openen van de buik vloeit veel vloeibaar bloed weg. In de longen twee haemorrhagische infarcten: in de lumbale-spieren vele bloedingen: aan de binnenzijde van de huid vele kleine erwt-groote bloedingen.

De beide niet bestraalde caviae werden meermalen gepuncteerd.

In de preparaten werden geen zuurvaste staafjes gevonden. De dieren werden na langen waarnemingstijd gedood (30/10'31 en 10/6'32) zonder dat tuberculeuse veranderingen te vinden waren, evenmin zuurvaste bacillen in de klieren.

Deze inleidende proefneming leerde ons, dat een dosis van 250 R. waarschijnlijk te groot is. Bij het proefdier ontstond een haemorrhagische diathese.

Om dezen indruk te controleren werd in de volgende

proef (proef II, zie tabel) een zelfde dosis gegeven als in proef I. Hierbij bleek, dat slechts één van de drie bestraalde caviae na eenige dagen dezelfde verschijnselen vertoonde als die van proef I.

Deze cavia I vertoonde 8 dagen na bestraling verschijnselen van loomheid, zat in elkaar en bewoog zich moeilijk voort. Bij de sectie waren er bloedingen in den buikwand (punctieplaats); bloedinkjes op het peritoneum parietale en viscerales. Aan de binnenzijde van de huid eveneens verspreide kleinere bloedinkjes.

Cavia II, eveneens bestraald, had 17/8'31, dus 5 dagen na inspuiting meerdere zuurvaste staafjes in het peritonaalexudaat. Dit werd gemengd met physiologisch water en bij een cavia intraperitonaal ingespoten. Deze cavia vertoonde in het punctaat 6 dagen na inspuiting geen afwijkingen en ook bij de sectie op 8/10'31 werden geen afwijkingen of zuurvaste bacillen in de klieren gevonden. Bij de sectie van deze Cavia II werd een verweekte submaxillaire klier gevonden.

De etter, die geen tuberkelbacillen bevatte, werd bij een cavia ingespoten. Deze vertoonde tijdens den langen waarnemingstijd (van 3/9'31 tot 18/4'32) geen ziekteverschijnselen en bij de sectie werden geen tuberculeuse veranderingen gevonden. Wel waren er enkele vergrootte klieren, maar zuurvaste staafjes waren niet te vinden. Ook in de milt, die licht vergroot was, werden geen bacillen gevonden en pathologisch anatomisch ook geen tuberculeuse ontsteking.

De caviae III en IV gaven een geheel negatief resultaat.

Proef III.

In deze proef werden de caviae bestraald direct na de interperitoneale inspuiting van het sputumfiltraat. De dosis werd teruggebracht tot 100 R. door de caviae gedurende 8 minuten te bestralen.

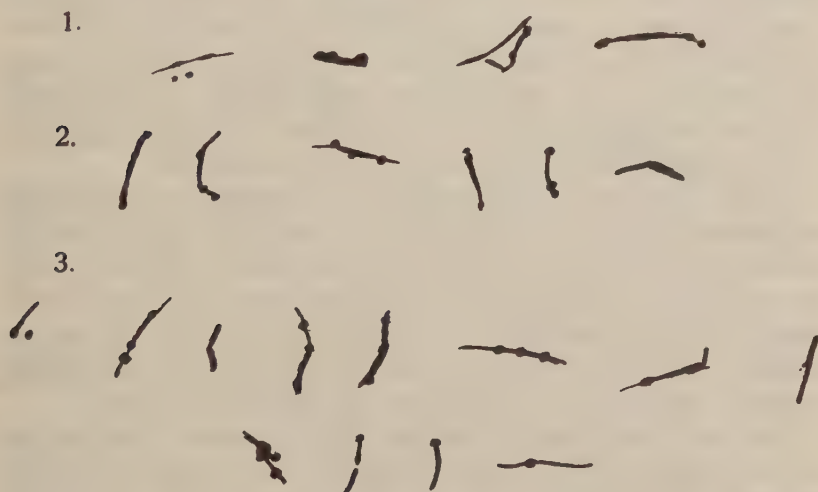
Hierbij zijn 2 feiten voor den dag gekomen, die de aandacht verdienen. In de eerste plaats zijn de 4 caviae, die zijn ingespoten met miltbrij van cavia I, die zelf, behalve een vergrooting van de trachebronchiale klieren geen afwijkingen vertoonde en geen zuurvaste bacillen in de klieren, allen gestorven onder het beeld van de *progressieve cachexie*.

In de literatuur over het filtreerbaar virus komt dit ziektebeeld bij sommige proefnemingen meermalen voor en het is ons opgevallen, dat deze passagedieren vrijwel hetzelfde beeld vertoonen, zonder dat zuurvaste bacillen konden worden aangetoond.

Van meer beteekenis is echter de volgende waarneming. Cavia III van deze proefreeks vertoonde bij de sectie 70

dagen na de inspuiting op enkele plaatsen in het lichaam kleine afwijkingen, nl. gezwollen klieren onder den milt, vergrooting van den milt en enkele kleine speldeknoopgroote haardjes in de longen. In al deze afwijkingen konden met zekerheid *tuberkelbacillen* worden aangetoond (zie teekening).

De andere caviae vertoonden geen afwijkingen ongeacht of ze al of niet bestraald waren.



Tuberkelbacillen uit de organen van cavia III proef III, gedood 70 dagen na intraperitoneale inspuiting van sputumfiltraat, nadat het proefdier voorbehandeld was met Röntgenstralen.

1. Longhaard. 2. Milt. 3. Mesenteriale klier.

Proef IV.

Nog opvallender dan in de vorige proefnemingen was het resultaat in deze proefreeks.

Ongeveer 1 maand na de inspuiting van het filtraat werd de caviae 2 maal bestraald met 10 dagen tusschenruimte, telkens met eenzelfde dosis als in proef III. Beide bestraalde en met filtraat intraperitonaal ingespoten caviae zijn na resp. 113 en 185 gestorven en hadden een *uitgebreide verkazende tuberculose*.

Over den invloed van röntgenstralen op het beloop van de filtraattuberculose bij caviae en konijnen werden tijdens de uit-

voering van deze proeven door *Nasta, Iovin* en *Blehmman*⁶⁾ onderzoeken gepubliceerd.

Zij vonden in een eerste serie proeven, dat na inspuiting van filtraat bij het konijn, blootgesteld aan röntgenstralen ($3 \times$ bestralen met tusschenruimten van 5 dagen) een ziekte ontstaat, die zich kenmerkt door het optreden van een totale paralyse in de achterpooten kort voor den dood, welke 7—13 dagen na inspuiting van filtraat en na de 2e of 3e bestraling intreedt. Contrôledieren en bestraalde konijnen ingespoten met filtraat, dat een $\frac{1}{2}$ uur op 120° C. was verwarmd, vertoonden geen afwijkingen. In deze mededeeling wordt verder niet gesproken over de afwijkingen, die de proefdieren vertoonden, evenmin of tuberkelbacillen in de klieren gevonden werden.

Ook vinden we geen nauwkeurige gegevens in een tweede mededeeling, waarin alleen wordt vermeld, dat de minimum-bestraling $3 \times$ met 5 dagen tusschenruimte moet geschieden om doodelijke toxische verschijnselen te krijgen. Tevens wordt gewezen op het verschil in de individuele gevoeligheid van de caviae en het vermoeden geopperd, dat ook de schadelijke werking van het filtraat misschien niet altijd even groot is.

In een derde serie proeven worden meer nauwkeurige onderzoeken medegedeeld. Nagegaan werd of de doodelijke toxische verschijnselen van de bestraalde caviae, ingespoten met filtraat, over te brengen is door dierpassage, om aan te toonen, dat deze verschijnselen worden veroorzaakt door het filtreerbaar virus en niet door de schadelijke werking van de gefiltreerde producten.

Hierbij deden zij de volgende waarnemingen:

1. 2 caviae worden met 5 cc. filtraat van tuberkelbacillenhoudende urine ingespoten: de één sterft na 135 dagen en de andere wordt 49 dagen na de inspuiting gedood. Bij geen van beide zijn tuberculeuse veranderingen te vinden.

⁶⁾ *M. Nasta, I. Iovin et M. Blehmman.*

1. Action pathogène du virus tuberculeux filtrable pour le lapin soumis à l'action des rayons X. C.R.C.B. T 105, pag. 49.

2. Importance de la durée des irradiations et de la dose inoculée, dans la production de la maladie toxique déterminée par le virus tuberculeux filtrable chez le cobaye irradié par les rayons X. C.R.S.B. T 107, pag. 847.

3. Transmission par passage de la maladie toxique mortelle déterminée par le virus tuberculeux filtrable chez le cobaye exposé aux rayons X. C.R.S.B. T 107, pag. 849.

Van een cavia, welke 1 \times bestraald was en 7 dagen na inspuiting van hetzelfde urinefiltraat wordt gedood, wordt orgaanbrij ingespoten bij 2 caviae: een sterft na 9 dagen en was 2 \times bestraald en de ander sterft 14 dagen na inspuiting en was 3 \times bestraald.

Beide dieren hadden een duidelijke miltvergroting en ver-groote klieren; bij één van deze dieren was de milt doorzaaid met talrijke „zuurvaste” bacillen.

2. 2 caviae, 2 \times bestraald, worden ingespoten met filtraat van bacillenhoudende urine en sterven 11 en 12 dagen na de inspuiting. De organen van één van deze dieren worden bij 4 caviae ingespoten, 2 bestraalde, 2 niet bestraalde. De eerste twee zijn na 5 en 17 dagen gestorven, zonder dat ver-meld wordt wat bij de sectie werd gevonden: de twee niet be-straalde caviae sterven 30 en 40 dagen na inspuiting en één van deze vertoont in de klierbrij talrijke tuberkelbacillen.

3. 2 caviae, 3 \times bestraald, sterven na 21 en 15 dagen en bij één van deze worden eveneens in de klieren talrijke bacillen gevonden. De onderzoekers concludeeren uit deze proeven, dat er na overenting van organen van caviae, ingespoten met fil-treerbaar virus, bij de passagedieren doodelijke toxische ver-schijnselen optreden, wanneer zij met röntgenstralen zijn be-handeld en dat deze verschijnselen optreden, zoowel bij inspu-ting van organen van caviae, die niet, als die wel bestraald zijn.

Zij wijzen er tevens op, dat men, zoowel bij de bestraalde caviae als bij de passagedieren een belangrijke toename van het aantal bacillen kan waarnemen, in sommige gevallen met typische tuberculeuse veranderingen. In overeenstemming met sommige resultaten in onze proefnemingen, vinden ook deze onderzoekers meer dan eens duidelijke tuberculeuse afwijkingen.

Vele onderzoekers is het niet gelukt met de door de Franschen aangegeven werkwijze positieve resultaten, wat be-treft het vinden van zuurvaste bacillen, te verkrijgen, zoodat meerderen zich hebben uitgesproken tegen het bestaan van een filtreerbaar tuberculosevirus.

Men heeft niet het recht de positieve gegevens van *Calmette*, *Valtis* en anderen te verklaren door fouten in de techniek en blijft het moeilijk te begrijpen, waarom zij zulke duidelijke resultaten hebben.

De onnauwkeurigheid van het onderzoek der proefdieren en orgaanpreparaten is evenmin een voldoende argument om eventuele negatieve bevindingen te kunnen verklaren, daar men mag aannemen, dat ook degenen, die geen zuurvaste bacillen konden vinden, hun preparaten minitueus hebben bekeken, vooral ook, omdat hierop telkens weer de nadruk gelegd wordt. Het spreekt vanzelf, dat onze boven medegedeelde proefnemingen nog slechts een inleiding zijn tot de bestudeering van het vraagstuk van den invloed van röntgenstralen op het ontstaan van tuberculose bij de met filtraat van tuberculeus materiaal ingespoten caviae. De weinige proeven, die wij konden nemen, zijn nog niet voldoende om in dezen een gevestigd oordeel te kunnen uitspreken.

Toch geven onze resultaten voldoende reden om aan te nemen, dat het mogelijk is, door bestraling met röntgenstralen duidelijke resultaten te verkrijgen.

Vooreerst zullen in grootere proefseries nader de voorwaarden moeten worden onderzocht, waarbij het effect van de bestraling zoo groot mogelijk is. De onderzoekingen van *Nasta*, *Iovin* en *Blechnann* maken het waarschijnlijk, dat meermalen bestralen met kleine dosis meer doeltreffend zijn.

Bovendien zal moeten worden geëischt, dat de röntgenbestraling in het meerendeel der gevallen positieve resultaten geeft. Blijkt het, dat de bestraalde caviae steeds of bijna steeds duidelijke tuberculeuse veranderingen vertoonen, terwijl de alleen met filtraat ingespoten dieren geen veranderingen te zien geven en geen zuurvaste staafjes in de klieren hebben, dan mag in ieder geval wel worden aangenomen, dat er een vorm van tuberculosevirus bestaat, welke in staat is de gebruikelijke filters te passeeren. Op één ding moet dan echter nog gelet worden. Waar er, vooral den laatsten tijd (o.a. door *Calmette*) nog weer eens op gewezen is, dat de spontane tuberculose bij caviae niet zoo zeldzaam is als vroeger wel gedacht werd, bestaat de mogelijkheid, dat eventueel latent aanwezige tuberculeuse veranderingen onder invloed van röntgenbestraling zouden kunnen worden geactiveerd en zoo positieve resultaten zouden kunnen geven.

Het is daarom noodig een aantal caviae met röntgenstralen te behandelen zonder inspuitingen met filtraat. Levert ook dit een negatief resultaat, dan is het aannemelijk, dat de positieve

resultaten bij de filtraatcaviae hun oorzaak vinden in het filtraat zelf.

Welke vorm van het tuberculosevirus in het filtraat de tuberculeuse veranderingen te voorschijn roept, zal eerst daarna onderzocht kunnen worden.

De bedoeling van deze mededeelingen is voornamelijk anderen aan te sporen dit onderzoek voort te zetten, omdat mij hiertoe den tijd ontbreekt.

Samenvatting.

Medegedeeld wordt het resultaat van eenige proeven, welke ten doel hadden na te gaan of bestraling met röntgenstralen van caviae, ingespoten met filtraten van culturen van tuberkelbacillen en tuberculeus materiaal, van invloed is op het ontstaan van tuberculose bij deze dieren. Bij één cavia konden gelocaliseerde veranderingen in milt, mesenteriale klier en longen worden aangetoond, waarin tuberkelbacillen gevonden werden. Na inspuiting van miltbrij van een andere cavia van dezelfde proefreeks bij 4 caviae, ontstond bij allen een progressieve cachexie.

In een andere proef (IV), stierven de twee caviae, welke $2 \times$ bestraald waren, ± 1 maand na inspuiting van filtraat, met een tussenruimte van 10 dagen, na 113 en 185 dagen aan verkazende tuberculose.

Vlies van 14 dagen oude cultuur van T.B. bacillen (T.H.) op Sauton gemengd met 100 cc. physiol. water, gefiltreerd door L_2 en daarna door L_3 . Geënt intraperitoneaal bij 3e caviae.

11/8'31			
5/8'31			
bestraald			
	Cavia I	13/8'31	buikpunctie: geen zuurvaste staafjes 13/8'31 †. overal <i>bloedingen</i> .
	Cavia II	†. sterft, na bestraling. vóór inspuiting.	
	Cavia III	13/8'31	buikpunctie: geen zuurvaste staafjes 18/8'31 buikpunctie: geen zuurvaste staafjes 10/6'32 †. geen tuberculose.
niet bestraald	Cavia IV	13/8'31	buikpunctie: geen zuurvaste staafjes 18/8'31 buikpunctie: geen zuurvaste staafjes 30/10'3 †. geen tuberculose.
Proef I.			

Vlies van 14 dagen oude T.B. cultuur (T.H.) op Sauton, gemengd met 50 cc. physiol. water; daarna gefiltreerd door Chamberland L₂ en vervolgens door L₃.

Proef II.

12/8'31

Cavia I
 14/8'31 buikpunctie:
 geen zuurvaste staaftjes
 17/8'31 buikpunctie: geen zuurv. st.
 19/8'31 ziek: gedood door cloroform.
sectie: bloedingen, geen
 tuberculose.

11/8'31

bestraald.
 5 cc. filtr.
 intraperit.

Cavia II
 14/8'31 buikpunctie:
 geen zuurvaste staaftjes.
 17/8'31 buikpunctie:
 zuurv. staaftjes.
 19/8'31 in buik 25 cc. physiolwater
 punctie.
 3/9'31 †. chloroform.: vergroote
 submax. klier met etter:

Cavia III
 14/8'31 buikpunctie:
 geen zuurvaste staaftjes.
 17/8'31 buikpunctie:
 geen zuurvaste staaftjes.
 21/3'32 †. geen afw.

niet be-
 straald.
 3 cc. filtr.
 intrap.

Cavia IV
 14/8'31 buikpunctie: geen zuurv. st.
 17/8'31 buikpunctie: geen zuurv. st.
 21/3'32 †. geen afw.

punctaat
 6 cc. intrap
 ingespoten
 bij:
 25/ 8'31 buikpunctie: geen zuurv. st.
 Cavia C.C. 8/10'31 ± chloroform:
 sectie: geen afwijkingen.
 18/4'32 †. chloroform.
 Sectie: enkele gezwollen klieren: milt wat
 vergroot.
 Geen tuberculose: *Path. anatomisch*:
 geen tbc ontsteking (Dr. Jonkhoff).

25 cc. bacillenhoudend sputum wordt gemengd met 100 cc. physiol. water, daarna 2×24 uur in broedstoof. 21/8'31 gefiltreerd door L_2 en L_3 . Filtraat in broedstoof gedurende den nacht. 6 caviae krijgen elk 5 cc. filtraat intraperitoneaal: 4 worden bestraald, 2 niet bestraald.

22/8-31		bestraald.		niet bestraald.	
Cavia I	<div> <div>26/ 8'31 29/12'31</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. gedood: Sectie: milt iets vergroot, tracheobr. klieren vergroot. In beide longen kleine bloedinkjes. </div> </div>	<div> Milt finggeweven met physiol. water intrap. geënt bij 4 cavia. </div>	<div> Gewicht: 587 Gr. 537 Gr. </div>	Cavia I 9/2'32	†. geen tuberculose: vermagerd. Gew. 407 Gr.
Cavia II	<div> <div>26/ 8'31 17/11'31</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. sectie: geen tuberculose. </div> </div>		<div> 570 Gr. 400 Gr. </div>	Cavia IV 7/3'32	†. gedood: geen tuberculose: vermagerd. Gew. 515 Gr.
Cavia III	<div> <div>26/ 8'31 30/10'31</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. sectie: gezwollen klieren onder milt; milt vergroot. In de longen enkele speldeknoopgroote hardjes. </div> </div>				
preparaten: <i>Tuberkelbacillen</i> (zie teekening).					
Cavia IV	<div> <div>26/ 8'31 9/11'31</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. sectie: in de long een hardje. </div> </div>				
Cavia V	<div> <div>26/ 8'31 9/11'31</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. sectie: geen tuberculose. </div> </div>				
Cavia VI	<div> <div>26/ 8'31 21/ 3'32</div> <div> buikpunctie: geen zuurv. st. †. sectie: geen tuberculose. </div> </div>				

Proef III.

10 cc. bacillenhoudend sputum wordt gemengd met 250 cc. physiol. water, daarna 3 × 24 uur in broedstoom gezet bij 37° C geschud en gefiltreerd door L₃ (2 ×). 3e caviae worden intraperitoneaal geënt met 10 cc. van het filtraat.

20/6'32	Cavia I (niet be- straald)	24/ 6'32	†. geen afwijkingen. Van meerdere klieren en organen preparaten gemaakt. Geen zuurvaste staafjes.
	Cavia II (niet inge- spoten met filtraat)		Steeds goed gebleven; na 1 jaar nog in leven.
Bestraald. 22/7'32 2/8'32	Cavia III	11/10'32	gestorven, sterk vermagerd. In longen zeer veel tuberkels, klieren in lies en mesenterium vergroot, verkaasd. <i>Tuberkelbacillen: Positief.</i>
	Cavia IV	22/12'32	gestorven. Sterk vermagerd. Liesklieren vergroot en verkaasd. Milt zeer sterk vergroot met talrijke tuberkels en geheel ver- kaasde gedeelten. Lever bevat veel tuberkels, eveneens de longen. Mesenteriale klieren sterk vergroot. <i>Tuberkelbacillen: Positief.</i>

Proef IV.

Vergelijkend onderzoek naar de hygienische waarde van verschillende desinfectiemethoden van zwemwater II.

IV) Het chloor-marmer procédé.

V) De desinfectie door zilvernitraat, c.q. het electrokatadyn-procédé.

DOOR

Dr. J. IDZERDA en JANNY WILDERVANCK.

Inleiding.

In een vorig artikel werd over de resultaten bericht van een door ons ingesteld vergelijkend onderzoek 1) naar de hygiënische waarde van de desinfectie van zwemwater ¹⁾ door middel van chloor, chlooramine en chloor-koper. In deze mededeeling wordt nu in dit vergelijkend onderzoek betrokken het chloor-marmer procédé en de desinfectie door zilvernitraat, c.q. het z.g. „Elektro-Katadyn-Verfahren”.

In onze vorige publicaties hebben we uitéengezet dat er nog geen ideaal desinfectans bekend is dat aan de volgende eischen voldoet:

1e. het moet snel en intensief werken;

2e. het moet ongevoelig zijn voor het milieu waarin het wordt toegepast en ongevoelig voor verontreinigingen van allerlei aard;

3e. het moet gemakkelijk chemisch of electrochemisch quantitatief aan te toonen zijn, zóó, dat uit de uitkomsten van deze proef de maat van desinfecteerende werking valt af te

¹⁾ Voor onze definitie van „zwemwater” verwijzen wij naar genoemde publicatie.

leiden, waardoor een meer ingewikkelde bacteriologische contrôle niet dagelijks noodig is;

4e. zijn aanwezigheid mag door de zwemmers niet of nauwelijks bemerkt worden, c.q. mogen zij daarvan geen hinder ondervinden;

5e. het desinfectans moet zoowel voor het continue als voor het periodieke systeem van waterreiniging bruikbaar zijn, mede in verband met den aard van de watervoorziening.

In principe behoeft ons niet te verbazen dat aan de gestelde eischen niet gemakkelijk is te voldoen, daar toch de werking van bijna alle desinfectantia sterk van het milieu afhankelijk is en juist het milieu waarin wij het desinfectans willen gebruiken in den regel afwijkt van dat waarin de werking van het desinfectans experimenteel beproefd wordt (leiding-water, c.q. aq. dest.).

Zoo zal het een groot verschil uitmaken of men een desinfectans wil toepassen bij een continue of een periodiek systeem van zwemwaterreiniging met of zonder filterinstallatie, indien daarbij overigens aan de verdere eischen, door ons aan zwemwater gesteld, wordt voldaan.

Is er wel een filterinstallatie aanwezig en wordt het gebruikte water wederom benut, dan ontstaat op den duur een milieu dat in samenstelling sterk afwijkt van het water waarmee het bassin werd gevuld.

Beschikt men daarentegen over een zoodanige hoeveelheid verwarmd versch water, dat voor iederen zwemmer $1\frac{1}{2}$ M³ gebruikt bassinwater kan vervangen worden door dezelfde hoeveelheid versch water, dan zal de werking van een desinfectans in het gebruikte bassin in veel mindere mate afwijken van die, welke bij experimenteel onderzoek gevonden is in het water waarmee het bassin de eerste maal werd gevuld.

Bij verschillende desinfectiemethoden is gebleken dat de gevoeligheid voor verontreinigingen hoogst verschillend is.

De desinfectie door chloor wordt in de practijk in de meeste gevallen door de chloorbindende eigenschappen van het milieu illusoir gemaakt; de aantrekkelijkheid van de desinfectie door chlooramine is daarentegen juist gelegen in de betrekkelijke ongevoeligheid van dit desinfectans voor verontreinigingen, waarbij in principe de desinfecteerende werking langzamer is dan die van chloor; het chloor-koper-procédé

daarentegen kan juist bij vervuild water een onverwacht gunstige werking ontplooiën, wanneer men tenminste zoo gelukkig is met dit nog zuiver empirisch toegepaste procédé resultaten te verkrijgen t.o. van een bepaalde standaard desinfectieproef.

Over bezwaren, door zwemmers ondervonden, is door ons nog weinig gesproken. Door ons wordt voorloopig de desinfecteerende werking van het zwemwater belangrijker geacht dan de bezwaren die tot nu toe zijn ondervonden. Dit wil natuurlijk niet zeggen dat niet iedere verbetering op dit gebied door ons zal worden toegejuicht.

Als voorbeeld van een poging, om de bezwaren, ondervonden bij de chloreering van water in overdekte inrichtingen, wat betreft de atmosfeer in die inrichtingen te verbeteren, noemen wij:

Het chloor-marmer-procédé 2).

Uitgaande van het bekende en vroeger besproken evenwicht $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{HCl}$, wordt door Ditthorn 2) betoogd dat dit evenwicht naar rechts verschoven wordt door de HCl aan calcium carbonaat te binden:

$\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCl} \rightleftharpoons \text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$,
waarbij het chloor in „die fast geruchlosen unterchlorige Säure HClO” wordt omgezet.

Uit ons onderzoek is gebleken dat het procédé echter niet zóó eenvoudig verloopt als door Ditthorn voorgesteld.

Dr. Meerburg was zoo welwillend voor ons chemisch na te gaan of inderdaad veel HOCl bij deze reactie ontstaat.

Daartoe werd chloorgas in aq. dest. geleid en deze oplossing verdund tot een concentratie 200 mg Cl_2 L., jodometrisch getitreerd. Deze oplossing werd over twee, met kaliumbichromaat en zwavelzuur goed gereinigde, flesschen verdeeld. In één der flesschen bevond zich zuiver marmer. Na een $\frac{1}{2}$ uur staan werd in de flesch die met marmer was voorbehandeld een niet prikkelende, doch hevig onaangename geur waargenomen. Het HOCl gehalte was in dit met marmer voorbehandelde chloorwater zéér laag. Voor deze waarneming geven wij de volgende verklaring:

Het onderchlorigzuur is gedissocieerd en er treedt hydrolyse van het ClO^- ion op:



Holwerda 9) berekent als waarde voor de hydrolyse con-

stante van het ClO^- ion bij 25°C. : 2.4×10^{-7} en leidt hieruit af:

$$\frac{(\text{HOCl})}{(\text{ClO}^-)} = 2.3 \times 10^7 \times (\text{H}^+).$$

Uit dit gegeven kan men voor iedere pH het % van het aanwezige chloor als HOCl berekenen; dit % neemt sterk af bij toenemende pH . Waar nu door de toevoeging van marmer de pH belangrijk wordt verhoogd is hierdoor te verklaren dat in het met marmer behandelde chloorwater betrekkelijk weinig HOCl kan worden aangetoond; gemeten toch met de glaselectrode, vonden wij in leidingwater met 800 mg $\text{Cl}_2/\text{L.}$, $\text{pH} = 1$; nadat op deze vloeistof gedurende een half uur marmer had ingewerkt, bedroeg de pH : 6.94.

Daar ons echter het meeste interesseerde:

1. of het procédé aan zijn doel beantwoordt;
2. of de desinfectie hierbij verandert, verrichtten wij de volgende experimenten:

Zooowel van het niet, als van het met marmer behandelde chloorwater werden wisselende hoeveelheden aan telkens 1 L. niet chloorbindend leidingwater, $\text{pH} = 7.2$ toegevoegd, waardoor de pH practisch niet veranderde. Bij een bepaald concentratie van ongeveer 1 mg $\text{Cl}_2/\text{L.}$ werd door eenige personen in de ééne verdunning nog een prikkelende chloorlucht, in de andere geen geur waargenomen. Werd de doseering hoger genomen dan trad in de chloormarmerverdunning de vermelde onaangename geur op.

Vergelijkende desinfectieproeven werden gedaan met experimenten, waarbij, zooals dit in de practijk geschiedt, de sterke chloorgasoplossing ook in leidingwater werd bereid en vervolgens verdund. Om nog verschil in desinfectie te kunnen ontdekken moest met zwakke chloorconcentraties worden gewerkt, waarvoor 0.1 mg $\text{Cl}_2/\text{L.}$ werd gekozen. De chloorgasoplossing in leidingwater (200 mg $\text{Cl}_2/\text{L.}$) lieten wij gedurende $\frac{1}{2}$ uur op marmer inwerken, waarna 0.5 cc. bij 1 L. leidingwater werd gevoegd. Ter contrôle werd precies hetzelfde experiment verricht met hetzelfde chloorwater zonder marmer.

Na de verdunning vertoonden de methylooranje reactie en de o. tolidine proef alleen verschillen die binnen de grenzen van de fouten der methode liggen.

De desinfectieproef vertoonde het volgende resultaat bij toevoeging van 455 levende colibacteriën per cc.

	chloor alleen	chloor met marmer
na 45"	115	165
„ 90"	26	23
„ 3'	2	3
„ 6'	0	0

Voor de wijze waarop de desinfectieproeven worden uitgevoerd verwijzen wij naar onze vorige mededeeling 1).

Het schijnt ons overbodig onze overige experimenten te publiceeren, die werden ondernomen met het doel na te gaan of in het met chloor-marmer behandelde leiding-water misschien nog een verhoogde resistentie tegen verontreiniging aantoonbaar zou zijn. Door Holwerda o.a. is weliswaar gewezen op een grootere bestendigheid van een chlooroplossing bij hooge p_H , welke ook electrochemisch door de lagere oxydatiepotentiaal van chlooroplossingen met hoogere p_H is te verklaren; van de geconcentreerde chloor-marmeroplossing, waarin een grooter percentage ClO^- ionen is te verwachten dan in de chlooroplossing, moet dus de bestendigheid grooter zijn. Bij verdere verdunning wordt deze grootere bestendigheid echter wederom te niet gedaan, wanneer wij onze experimenten in niet-chloorbindend gebufferd water verrichten; de p_H toch, die ontstaat na toevoeging van de geconcentreerde oplossingen, bepaalt de verhouding $\frac{(HOCl)}{(OCl^-)}$ en daarmee de desinfectiewaarde. Het experimenteele onderzoek in genoemd milieu leverde dan ook geen resultaten op, die afwijken van de theoretisch te verwachten uitkomst, m.a.w. er werd in leidingwater, bij dezelfde p_H , geen verschil in gevoeligheid voor verontreinigingen waargenomen.

Een geheel ander verloop der proeven is te verwachten bij het toevoegen van de geconcentreerde chloor- of chloor-marmeroplossing aan een filtraat van een filterinstallatie, dus aan water met chloorbindende eigenschappen. Hier kan de grootere bestendigheid en ongevoeligheid voor verontreinigingen van de geconcentreerde chloor-marmeroplossing tot uiting komen, a. door een minder sterke chloorbinding dan bij toevoeging van een geconcentreerde chloorgasoplossing alléén en b. in het beter behouden blijven van chloorverbindingen welke desinfecteerende eigenschappen bezitten. De resultaten zullen echter volkomen afhankelijk zijn van de samenstelling van het milieu hetwelk gebruikt wordt om de geconcentreerde chloor-

gas-oplossing te bereiden, waarop vervolgens de samenstelling van het milieu waaraan deze geconcentreerde oplossing, na over marmer geleid te zijn, wordt toegevoegd, vervolgens zijn invloed doet gelden. Bij behandeling van zwemwater met het chloor-marmerprocédé is het dus niet uitgesloten dat een meer intensieve desinfectie wordt verkregen dan met chloor alleen.

Bij de contrôle van de toepassing van het procédé in de praktijk voegt Ditthorn 2) 1 mg Cl_2/L . aan het zwemwater van een overdekte inrichting toe. Waar het bacteriologische onderzoek geschiedde door het aantal levende bacteriën door middel van gelatineplaten en den colititer vast te stellen en waar de door Ditthorn aangegeven „kolorimetrisch ermittelten Werte an freiem Chlor” ons niets zeggen kunnen wij ons hieruit geen oordeel vormen over de hygiënische waarde dezer methode. Dat geen chloorlucht meer werd geroken bij toevoeging van 1 mg Cl_2/L . komt met onze experimenten goed overeen. Of met deze doseering echter een behoorlijke desinfectie snelheid van het bassinwater wordt verkregen is echter sterk aan twijfel onderhevig.

Samenvattend kunnen wij concludeeren dat bij de toepassing van het chloor-marmerprocédé voor de desinfectie van zwemwater, de mogelijkheid bestaat dat de chloor-doseering zal kunnen worden opgevoerd zonder dat daarbij een hinderlijke chloorlucht optreedt; waar echter bij het periodieke systeem van waterreiniging chloreering uitgesloten is en bij de gewone continue systemen van waterreiniging met circulatie wel chloor kan worden toegevoegd, maar dit niet als zoodanig werkzaam blijft, kan juist bij het chloor-marmerprocédé worden verwacht dat onder daartoe gunstige omstandigheden in zwemwater meer stabiele chloorverbindingen met desinfecteerende eigenschappen ontstaan.

Wij waren in de gelegenheid de juistheid van bovenstaande, op laboratoriumproeven berustende, uitspraak in de praktijk na te gaan, door in een overdekte zweminrichting het water achtereenvolgens alleen met chloorgas en na een zekere periode met het chloor-marmerprocédé te behandelen.

De voor een oppervlakkige beoordeeling noodige gegevens zijn de volgende: bassinhoud 400 M^3 ; turnoverperiode 5 uren; filtratie gedurende 15 uren per dag; aantal zwimmers gemiddeld per dag 456; suppletie met Utrechtsch leidingwater per dag ongeveer 5 M^3 ; p_{H} van het water, gemeten met de glaselectrode = 6.6.

Bij maximale toevoer van chloorgas, waarbij geen hinderlijke lucht

in de zwemzaal werd waargenomen, gaf de orthotolidine reactie van het zwemwater een waarde aan overeenkomende met 0.1 mg $\text{Cl}_2/\text{L.}$; dat de orthotolidine reactie hier geen werkzaam chloor in den vorm van HOCl aangaf, bleek zoowel uit den langen desinfectietijd bij de standaarddesinfectieproef, als uit de waarde van de oxydatiepotentiaal, gemeten volgens de methode, aangegeven door Remington en Trimble 13).

Na omschakeling op het chloor-marmer-procédé, werd na een maand waargenomen, a. dat bij gelijke doseering van chloorgas in het algemeen de o. tolidine reactie hogere waarden aangaf; ook hierbij was de methyl-oranje reactie negatief; de desinfectietijd was in overeenstemming met de hogere o. tolidine waarde iets versneld, de oxydatiepotentiaal was ongeveer gelijk gebleven, de p_{H} van het water iets verhoogd; b. dat het mogelijk bleek de toevoer van het chloorgas driemaal te vergrooten zonder dat hinder werd waargenomen; desinfectiesnelheden als met chloramine desinfectie werden hierbij bereikt; uit de waarde van de oxydatie-potentiaal kon worden afgeleid dat het chloor in den vorm van chloramine aanwezig was. De p_{H} van het water was gestegen tot 6.9. Wij moeten met deze oppervlakkige mededeeling volstaan, daar een volledige uiteenzetting van de ingewikkelde verhoudingen te ver zou voeren.

De 4 besproken desinfectiemethoden hebben alle dit gemeen, dat zelfs in groote doseering de helderheid van het zwemwater, hoe de samenstelling verder ook mag zijn, niet wordt beïnvloed.

Met dezen factor hebben wij daarentegen rekening te houden bij het volgende procédé:

De desinfectie door zilvernitraat, c.q. het electro-katadyn-procédé.

Inleiding. Het is een bekend verschijnsel dat het verblijf van een zilverdraad in aq. dest. aan dit water een zeker desinfecteerend vermogen verleent: de z.g. oligodynamische werking. (voor literatuur overzicht zie 12). Men kan het desinfecteerend vermogen doen toenemen door de contactoppervlakte met het zilver te vergrooten en de techniek heeft tegenwoordig voor deze meer intensieve oligodynamische werking den naam katadynwerking aangegeven.

De oorzaak van de desinfecteerende werking is langen tijd een strijdvraag geweest, waaraan een ontelbaar aantal wetenschappelijke artikelen is gewijd. De laatste jaren is echter gebleken dat de oligodynamische werking een metaalzoutwerking is (vorming van oxyden of carbonaten) (Doerr, Leitner 2), en dat de desinfecteerende werking afhankelijk is van de dissociatie van dit gevormde zout, d.w.z. van het aantal vrije metaal-

ionen dat zich in het milieu bevindt. De proef op de som is wel het experiment waarbij, door een stikstofstroom, uit het aq. dest. de zuurstof en het koolzuur verwijderd worden; hoe lang men onder deze omstandigheid een zilverdraad in dit milieu laat vertoeven — geen spoor van desinfecteerende werking zal dit milieu vertoonen.

Is inderdaad de desinfecteerende werking alleen afhankelijk van het aantal vrije zilverionen, dan moet

1. de desinfecteerende werking onafhankelijk zijn van de wijze waarop men deze doet ontstaan: of door het toevoegen van een meer of minder dissocieerend zilverzout, hetzij door eenvoudig een oligodynamische werking te voorschijn te roepen door het doen vertoeven van zilver in het milieu, hetzij door electrolyse, aan welk laatste procédé de techniek den naam „electro-katadyn” heeft verbonden; door Leitner is bewezen dat bij een door hem toegepaste standaarddesinfectieproef bij 37° C. het desinfectieresultaat bij gelijke vrije zilverionenconcentratie onafhankelijk is van methodiek waarmee deze zilverionenconcentraties in aq. dest. wordt verkregen: n.l. hetzij door toevoegen van zilverchlorideoplossing, hetzij door toevoegen van zilvernitraat, hetzij door op een bepaalde wijze bereid oligodynamisch werkend aq. dest.

2. bij gelijke zilverionenconcentratie in verschillend milieu de desinfecteerende werking gelijk zijn.

Wat het onder 2 genoemde punt betreft, door Leitner 3) is door middel van experimenten over de oligodynamische werking van Cu aangetoond dat bij toevoeging van bepaalde electrolyten aan oligodynamisch actief aq. dest., bij gelijkblijvende Cu-ionen concentratie, de desinfectie kan worden beïnvloed door vermindering van de negatieve lading der bacteriën. Voor theoretische beschouwingen is dit punt natuurlijk van groote beteekenis. Bovendien moet op de p_H van het milieu worden gelet daar bij $p_H = 4.5$ een volledige remming der bactericide werking optrad, welke remming bij $p_H = 7$ — werd opgeheven, wederom bij gelijke vrije-metaalionenconcentratie. Wanneer dus de samenstelling van het milieu de mogelijkheid van remmende invloeden doet vermoeden, kan de desinfecteerende werking niet steeds uit de bepaalde vrije zilverionenconcentratie worden afgeleid op grond van waarnemingen in een ander milieu, maar moet deze bacteriologisch worden

vastgesteld, hetgeen, zooals zal blijken, niet zoo eenvoudig is als bij de desinfectieproeven met chloor en chlooramine.

Experimenteel gedeelte. Op grond van voorgaande beschouwingen werden de experimenten in het algemeen verricht met zilvernitraat, waaraan eenige experimenten met een door den importeur beschikbaar gesteld „electro-katadyn toestel” werden aangesloten.

Als methode om de concentratie vrije zilverionen te bepalen werd de potentiometrische methode gekozen en eerst de nauwkeurigheid dezer methode vastgesteld door de potentialen eene electrolytisch verzilverde zilverdraad in sterk verdunde AgNO_3 oplossingen in aq. dest. te meten.

Vervolgens werden de desinfectietijden dezer verschillende zilverionen-concentraties vastgesteld, geldende voor een bepaalde standaardproef.

Daarna werden dezelfde waarnemingen verricht zoowel in leidingwater als in filtraat uit een filter van een continu zwemwaterreinigingssysteem, waarbij hetzelfde leidingwater als suppletiewater dienst doet. In het eerste geval werden zoowel verschillende concentraties zilvernitraat toegevoegd als het water met het electro-katadyn toestel behandeld.

Een nadere beschrijving moge hier volgen.

1. De meting der vrije zilverionenconcentratie:

Wanneer een zilverelectrode in een oplossing van zilverionen wordt gebracht geldt voor de potentiaal dezer zilverelectrode bij 22°C :

$E = e_0 + 0.0585 \log [A_g^+]$, waarbij e_0 de normaalpotentiaal der electrode voorstelt, d.w.z. de tegen de normaal waterstof-electrode gemeten electromotorische kracht van den zilverstaaf in een oplossing waarbij de ionenactiviteit = 1. De waarde dezer normaalpotentiaal wordt in de handboeken verschillend opgegeven (door Höber + 0.771 V, door Kolthoff + 0.808 V). Wij zullen bij ons onderzoek de ionenconcentratie met de ionenactiviteit gelijk stellen.

Uit de formule volgt dat de potentiaal van deze zilverelectrode lineair van de zilverionenexponent der oplossing afhankelijk moet zijn. Daar wij de potentiaal van één electrode niet kunnen meten, moet men andere wegen toepassen. Men kan 1) het potentiaalverschil van 2 zilverelectroden in oplossingen van 2 verschillende zilverionenconcentraties ten opzichte

van elkaar meten. Dan geldt de formule $E = 0.591 \log \frac{[c_1]}{[c_2]}$ (bij 25° C.).

Is een der concentraties bekend, dan kan de andere berekend worden;

2. of men kan het potentiaalverschil van de zilverelectrode en een vergelijkingselectrode meten en de potentiaal van deze ten opzichte van de normaalwaterstofelectrode in rekening brengen.

Deze laatste methode werd door ons gevolgd. Als vergelijkingselectrode werd de verzadigde kalomelelectrode gebruikt, terwijl een natriumnitraat vloeistofverbinding werd ingeschakeld.

Voor de meting werd gebruik gemaakt van een potentiometer met uiterst fijnen galvanometer met voorgeschakelden hoogen weerstand als nulpuntinstrument; ook wel werd, om polarisatie der elektroden volledig uit te schakelen, gebruik gemaakt van een lampvoltmeter 11). Bij het onderzoek werden de volgende voorzorgen genomen: bij het bereiden van de verschillende AgNO_3 concentraties werd steeds voor iedere concentratie dezelfde kolf van Jena-glas gebruikt en de metingen zoo spoedig mogelijk na het bereiden der verdunningen verricht. De zilverelectrode werd na iedere meting in telkens versch. aq. dest. langen tijd afgespoeld.

Wel gelukte het regelmatig tot aan een concentratie van 0.000001 n. AgNO_3 de lineaire betrekking tusschen potentiaal en metaalionenexponent te vinden, bij 0.0000001 n. AgNO_3 echter niet meer.

Het mocht ons niet gelukken, niettegenstaande talrijke methoden werden toegepast 5), de electrode zoodanig te verzilveren dat bij de laatst genoemde concentratie een lineaire betrekking ten opzichte van de overige concentraties kon worden gevonden; behalve de electrode kan het gebruikte aq. dest. natuurlijk ook oorzaak zijn van de genoemde afwijking. Terwijl eenerzijds het opsporen van deze oorzaak een afzonderlijk onderzoek vereischt waartoe ons de gelegenheid ontbreekt, is het voor het doel van ons onderzoek overbodig, daar de desinfectietijden bij $\pm 22^\circ \text{C.}$ bij de standaarddesinfectieproef verkregen bij dergelijke verdunningen reeds zoo lang zijn, dat zij in het gegeven verband buiten onze belangstelling vallen.

De metingen werden tenslotte verricht met een zilverdraad

van 1 mm. doorsnede, die over een lengte van 8 cm. kathodisch was verzilverd (2mA) door plaatsing in K. Zilvercyanide (5% AgNO_3) gedurende 10 uren.

2. De methodiek der desinfectieproef.

De vroeger 1) beschreven standaardproef werd in zooverre gewijzigd, dat de bacteriënemulsie werd vervaardigd in aq. dest. Deze kan niet, zooals de emulsie in NaCl 0.9%, gedurende 4 dagen worden bewaard, maar moet voor ieder experiment opnieuw worden bereid. Daar blijkens de contrôle het aantal levende bacteriën in het gebruikte aq. dest. vrij snel achteruitging, had het geen zin de proefnemingen over een langeren termijn dan ± 5 uren voort te zetten.

Het ligt echter in de bedoeling van iedere desinfectieproef het aantal levende bacteriën op een bepaald oogenblik vast te stellen; er moet dus voor gezorgd worden dat het desinfectans in den voedingsbodem die gebruikt wordt om de nog levende bacteriën gelegenheid te geven zichtbare koloniën te vormen, zijn werking niet verder kan uitoefenen. Worden deze voorzorgen niet genomen dan worden de resultaten van de desinfectieproef geflatteerd. Om dit te voorkomen moet dus theoretisch het desinfectans onwerkzaam gemaakt worden, alvorens een gedeelte van de te onderzoeken vloeistof tot een agarplaat wordt verwerkt, tenzij de vleeschbouillonagar zelve onmiddellijk het desinfectans onschadelijk maakt zooals dit bij de chloor en chlooramine desinfectieproeven geschiedt.

Dat dit laatste geval zich bij metaalionen niet voordoet, blijkt wel direct uit het klassieke experiment waarmede zoo gaarne de oligodynamische werking wordt gedemonstreerd: de zilvermunt in een geënte agarplaat. Vervolgens valt dit ook af te leiden uit de afwijkende kolonievormen die men ziet optreden; ook ziet men verschillen optreden wanneer men 0.1 cc. van de verdunning tot platen verwerkt in plaats van 1 cc en tenslotte leeren de o.m. door Pilod en Lodvelle 8) vermelde experimenten van Vignati en Schnabel 10) dat het bij proefnemingen met kopersulfaat, door toevoeging van K-citraat gelukt, een zeer merkbare verlenging van de eerst gevonden, schijnbare desinfectietijd te verkrijgen; m.a.w. er dient verschil gemaakt te worden tusschen een bacteriostatische en bactericide werking; wanneer wij dit onderscheid experimenteel niet maken, kunnen alleen schijnbare desinfectietijden worden vast-

gesteld, die in den regel korter zullen zijn dan de werkelijke desinfectietijden.

Leitner 3, 4) neemt aan dat de toevoeging van K-citraat aan CuSO_4 complexe zouten doet ontstaan.

Eenige proefnemingen leerden ons dat K-citraat met AgNO_3 zich daarentegen anders gedraagt: gemeten met de zilverelectrode toch verandert de potentiaal van een AgNO_3 oplossing in aq. dest. na toevoeging van K-citraat praktisch niet; het desinfectieresultaat wordt dan ook niet beïnvloed door toevoeging van K-citraat aan het milieu.

Over experimenten waarbij den invloed van $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ werd nagegaan zal elders worden bericht. Voor ons doel is het voldoende op de volgende wijze de schijnbare desinfectietijden te bepalen: aan het te onderzoeken water worden per cc. ± 1000 levende coli-bacteriën toegevoegd; na bepaalde tijden wordt 1 cc. tot een agarplaat verwerkt en het resultaat na 2×24 u. bij 37°C . afgelezen.

3. Vergelijkende experimenten:

Om het overzicht te vergemakkelijken hebben wij de resultaten in een graphiek samengesteld.

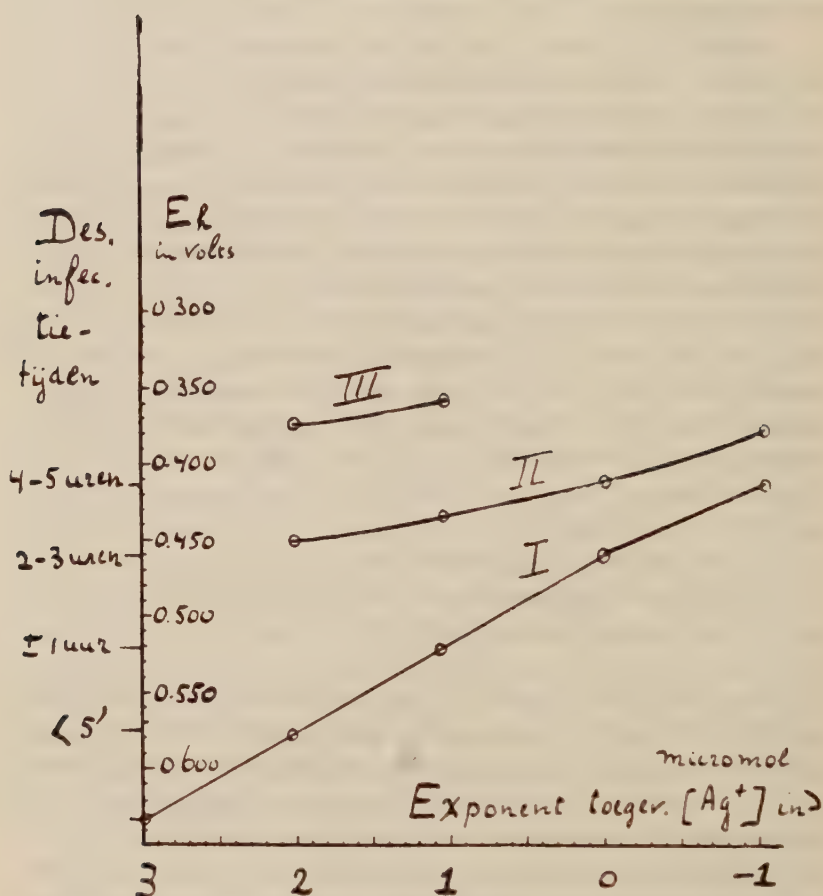
Toelichting bij graphiek I. Op de ordinaat zijn aangegeven de met de zilverelectrode gemeten potentialen in volts, berekend ten opzichte van de normaal waterstofelectrode; op de abscis zijn de exponenten van de toegevoegde Ag-ionen-concentraties in micromol uitgezet.

Is het milieu aq. dest., dan valt eerstens de lineaire betrekking tusschen de zilverionenexponent en de gemeten potentiaal op, die bij kleine zilverionenconcentraties een afwijking vertoont. De schijnbare desinfectietijden zijn voor één bepaalde methodiek aangegeven.

Wordt zilvernitraat toegevoegd aan Utrechtsch leidingwater, in een concentratie van 10^{-2} dan wordt dit zoodanig troebel dat het voor toepassing in de praktijk onbruikbaar is ¹⁾. Vergelijken wij het effect van kleine hoeveelheden AgNO_3 in dit water met het effect van de toevoeging van overeenkom-

¹⁾ In dezelfde concentraties toegevoegd aan drinkwater uit Hellevuetsluis ontstaan na eenigen tijd in een Jenaglakolf in het licht vuurroode, resp. gele kleuren die aan het optreden van photohaloïden (Freundlich l.c. p. 1110) moeten worden toegeschreven.

GRAPHIEK I.



stige hoeveelheden $AgNO_3$ aan aq. dest., dan zien wij een sterke daling van de potentiaal van de zilverelectrode, gepaard gaande aan een sterke verlenging van den schijnbaren desinfectietijd. De gemeten potentialen worden o.a. sterk beïnvloed door het ontstaan van $AgCl$, en de desinfectietijd komt practisch overeen met die, gevonden bij dezelfde zilverionenconcentratie in aq. dest.

Wordt vervolgens als milieu gekozen water uit de filter van een continu systeem van zwemwaterreiniging, gevoed met Utrechtsch leidingwater, dan daalt, bij toevoeging van dezelfde zilverionen-concentratie, de potentiaal nog verder. Na 6 uren

inwerking kon zelfs nog geen volledige schijnbare desinfectie worden bereikt. De troebeling die hierbij optrad was minder sterk dan bij leidingwater, waarschijnlijk door het aanwezige NH_3 .

In de contrôles was in beide gevallen het aantal levende bacteriën in den waarnemingstijd niet veranderd.

Tenslotte werd met het electro-katadyntoestel het volgende experiment verricht:

Nadat het toestel was gereinigd werd het gedurende een halven dag doorstroomd met leidingwater; een portie werd opgevangen en hierin de potentiaal bepaald van de zilverelectrode (+ 0.471 V). Vervolgens werd aan niet voorbehandeld leidingwater zooveel zilvernitraat toegevoegd totdat dezelfde potentiaal werd verkregen; van beide vloeistoffen werd het desinfectieresultaat bepaald, bij toevoeging van 1632 levende colibacteriën per cc.

TABEL I.

Desinfectietijd	Aantal overlevende bacteriën in vleeschbouillon-agar, pH = 7.2 na 3×24 uren bij 37°C .	
	Electro-Katadyn Leidingwater	Leidingwater + AgNO_3
30'	473	398
60'	348	292
120'	132	154
150'	92	75

Uit de tabel blijkt dat na $2\frac{1}{2}$ uur nog geen afdoend schijnbaar desinfectie resultaat is bereikt en dat de schijnbare desinfectie bij beide procédés volkomen parallel verloopt. In de practijk echter kan dit desinfectieresultaat niet worden bereikt, daar de troebeling in het water het gebruik van dergelijke concentraties onmogelijk maken.

Het is volkomen overbodig om, zooals in bijkans alle publicaties over electro-katadyn geschiedt, de toegevoegde hoeveelheid Ag te berekenen uit de stroomsterkte en de hoeveelheid geleverd water; hieruit valt niets af te leiden ten opzichte van de verkregen desinfectiewerking; bovendien blijkt in de practijk dat éénmaal per week de zilverelectrode gereinigd

moet worden. Door optredende neerslagen op de elektroden zal dus de afgescheiden hoeveelheid zilver bij gelijke stroomsterkte niet steeds dezelfde zijn. Wanneer Viesohn 7) beschrijft dat zich in hetzelfde zwemwater $\pm 590 \gamma$ Ag/L en algen bevinden dan is dit wel een frappant bewijs dat de vorm waarin zich dit zilver in het water bevond, toch wel zéér weinig werkzaam was. Dat hiermede toch in het bassin een voldoende lage colititer wordt verkregen hoeft ons niet te verbazen: om dit te bereiken is, bij niet te groot bezoek de aanwezigheid van een desinfectans met zeer geringe werking al voldoende b.v. zoodanig dat de desinfectieproef in ± 10 uren verloopt. Dit blijkt wel uit den betrekkelijk lagen colititer die men aantreft, wanneer zich in het water in het geheel geen desinfectans bevindt, hetgeen vroeger door een onzer is beschreven 6). Dat in zwemwater de vrije zilverionenconcentratie en daarmede de schijnbare desinfectie, door van zwemmers afkomstige verontreiniging ongunstig wordt beïnvloed, blijkt uit de graphiek. Voor het periodieke systeem is het procédé dus zeker ongeschikt. Bij continue systemen zal moeten blijken in hoeverre de vrije zilverionenconcentratie door het filtratieproces wordt beïnvloed. Men zou zich kunnen voorstellen dat bij een continue systeem zonder circulatie, water van geschikte samenstelling en gering bezoek, een matig effect zou kunnen worden verkregen. Doen deze omstandigheden zich niet voor dan zal het procédé in den regel of onbruikbaar of onbetaalbaar zijn, indien men prijs stelt op een korten desinfectietijd. Stelt men hierop geen prijs dan vereischt de vraag welk van de door ons behandelde vijf verschillende procédés de voorkeur verdient een afzonderlijk onderzoek, waarbij andere normen gesteld moeten worden.

Samenvatting.

Voor de toepassing van het chloor-marmer-procédé gelden niet dezelfde vermelde criteria als voor de toepassing van de gewone chloreering. Onder zeer bepaalde en zeer gunstige omstandigheden (b.v. korte turnoverperiode, niet overmatig bezoek, water van daartoe geschikte samenstelling zal het bij het continue systeem kunnen worden toegepast en zal het doel van dit procédé: het vermijden van de prikkelende chloorlucht in overdekte zweminrichtingen, kunnen worden bereikt; de

ervaring heeft ons geleerd dat bij gelijke chloordoseering, het chloor-marmer-procédé onder gunstige omstandigheden een verkorting van den desinfectietijd kan opleveren vergeleken bij de toepassing van chloor alleen, terwijl somtijds bovendien de chloortoevoeging kan worden vergroot met evenredig beter desinfectie resultaat.

Wat betreft de desinfectie door zilvernitraat, c.q. het electro-katadyn-systeem: in principe bestaat tusschen beiden geen verschil, daar het effect voornamelijk afhankelijk is van de vrije zilverionenconcentratie in het milieu waarin de desinfectie wordt toegepast. De methodiek der desinfectieproeven heeft invloed op den waargenomen desinfectietijd. Hoe kan worden verhinderd dat te veel vrije zilverionen in de agarplaat worden meegenomen en haar hun werking voortzetten, waardoor een te gunstig desinfectie resultaat wordt voorgespiegeld, is nog een punt van onderzoek.

Het nadeel van de toepassing van dit procédé bij zwemwater is hierin gelegen, dat eenerzijds in den regel de concentratie niet kan worden opgedreven omdat daarbij de helderheid van het water wordt beïnvloed, anderzijds de vergrooting van de concentratie geen evenredig betere desinfectie waarborgt.

Voor de toepassing bij het periodieke systeem is het procédé onbruikbaar; onder zeer bijzondere omstandigheden, (continu systeem zonder circulatie, weinig bezoek, water van geschikte samenstelling) zou misschien een matig effect te bereiken zijn. In dat geval zou het, afgezien van de kosten, voordeelen bieden door afwezigheid van hinder voor zwemmers: bij het gewone continue systeem met circulatie schijnt het ons niet mogelijk resultaten te verkrijgen, die het effect van een juist toegepaste chloreering of behandeling met chlooramine van zwemwater bij benadering evenaren.

LITERATUUR.

- 1) *Idzerda en Wildervanck.* Vergelijkend onderzoek naar de hygiënische waarde van eenige desinfectiemethoden van zwemwater. *Ned. Tijdschrift v. Hyg., Microbiol. en Serol.* 1933. 200.
- 2) *Ditthorn.* Beseitigung des Chlorgeruchs gechlorter Badewässer in Hallenschwimbädern. *Gesundheits Ing.* 1933, no. 26.
- 3) *Leitner.* Der Einfluss von Elektrolyten auf die bakterizide Wirkung von Kupfer und Silbersalzen (Erklärung der s.g. Salzhemmung der oligodynamischen Wirkung. *Biochem. Zeitschr.* 221. 1930. 42.

- 4) id. id. Oligodynamie — eine Metallionenwirkung. *Klinische Wochenschr.* 8. 1929. 1952.
- 5) *Freundlich*. Capillair Chemie. *Leipzig* 1923. S. 1021.
- 6) *Idzerda*. Over de hygiëne van zwemwater. *Ned. Tijdschr. v. Soc. Geneesk.* 1930. 12.
- 7) *Viesohn*. Sterilisation von Badewasser mittels Katadyn. *Ges. Ing.* 1933. no. 27.
- 8) *Pilod et Codvelle*. Action oligodynamique des Métaux. *Annales d'Hygiène* 1932. p. 654.
- 9) *Holwerda*. Dissertatie Delft 1929.
- 10) *Vignati u. Schnabel*. *Zeitschr. f. Bakt.* Orig. I. 1928. 109. 465.
- 11) *Idzerda en van Everdingen*. Dit Tijdschr. I. 1933. no. 2.
- 12) *Raadsveld*. De oligodynamische werking van metalen en metaalzouten. *Chem. Weekblad* 1934, no. 33 en 34.
- 13) *Remington and Trimble*. *J. Phys. Chem.* 1929, 33, 433.
- 14) *Schmelkes*. *Journ. of the A.W.W.A.* 1933, 25, 695.

Experiments proposed to solve definitely the influenza-problem

BY

Dr. E. BEMELMANS †

In 1933 Paul and Freese published in the American Journal of Hygiene (Vol. XVII, No. 3 May) the results of epidemiological and bacteriological studies on „common colds”, which were observed under the auspices of the International Health Division of the Rockefeller Foundation. This study covers a period of approximately eleven months in the isolated arctic community Longyear (Spitsbergen), with a population of 507. The shipping season lasts about four months, depending on ice conditions. There are no contacts with the outside world during the remainder of the year. During the eleven months of observation the incidence of „common colds” in Longyear City is approximately one attack per person a year. This frequency is about half as great as the one reported for the temperate zone. The first boat of the 1931 season arrived in Longyear City on May 23; there was no case among the ship's crew. About 48 hours later three cases were observed in the town. By the end of the first month 75 per cent of the Winter Community had suffered an attack and 90 per cent had been involved before the epidemic died out.

These epidemics are of annual occurrence; no important relation could be established with any of the various meteorological factors. There was no doubt that during the first two weeks of October (period of isolation) six persons with mild attacks of influenza were not able to transmit the infection to their neighbours. The explosive epidemic after the arrival of the first boat of the shipping season in May indicates that the

community had lost by that time what immunity it had possessed. Very few serious complications followed the disease; two patients developed otitis media, two others acute pleurisy.

In regard to the immunity it is very interesting that some persons seemed to have a complete immunity, while others developed an immunity of short duration (not shorter than 23 days) after an attack.

In my opinion no less interesting is the fact, shown by Paul and Freese's bacteriological observations, that the chief difference in the cultures of the nasopharynx from normal persons in Longyear City and those obtained in the temperate zone, was that staphylococci and *haemolytic streptococci* were virtually absent in the Spitsbergen population. So the study of Paul and Freese confirms the fact that the fixed types of pneumococci and haemolytic streptococci are rarely encountered in isolated communities.

In connection with these observations, these scientists assumed that the epidemic of „colds” is due to a filterable virus.

Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw published in the *Lancet* (8. 7. 1933) the results of an experimental study on influenza during the epidemic at the beginning of 1933. On the assumption that the aetiological agent of influenza was probably a filterable virus, throat-washings obtained from a number of influenza patients, as early as possible after the onset of definitive symptoms, were filtered before use through a membrane impermeable to bacteria. The filtrates were used in attempts to infect many different species. All such attempts were entirely unsuccessful until the ferret was used. The initial successful experiment was made with two ferrets, both of which received a filtrate of human throatwashings, both subcutaneously and by intranasal instillation. Both animals became obviously ill on the third day after infection, and exhibited symptoms of the characteristic influenza disease. The ferret looks ill, has fever, is quiet and lethargic, often refuses food and shows signs of muscular weakness. There are catarrhal symptoms, the eyes become watery and there is a variable amount of watery (afterwards mucopurulent) discharge from the nose. The ferret sneezes frequently and yawns repeatedly. It was found that the disease could be transmitted either by contact or by transference of nasal-washings from a sick to a

healthy ferret. In a few ferrets a typical diphasic temperature response has occurred without any nasal symptoms, and in one case well-marked symptoms were noted without any elevation of temperature. These animals when tested later were found to be immune. Very occasionally a ferret, a short time after recovery, has had a relapse in which the temperature curve and the symptoms have been similar to those of the primary illness.

The disease, which has never been fatal, has frequently been transmitted by placing a normal ferret in the same cage as a sick one for 24 hours. Ferrets which have recovered from the disease are found to be immune, and the serum of such a ferret neutralises emulsions of the virus. Human sera, particularly those from influenza convalescents, were found to contain antibodies capable of neutralising the virus of the ferret disease. Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw consider that the above results with ferrets, so far as they have gone, are consistent with the view *that epidemic influenza in man is caused by a filterable virus.*

It will appear later, that the opinion of Paul and Freese and this of Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw, cannot be accepted, and that all the mentioned observations made in an isolated community and in ferrets are exactly in line with my views of the aetiological character of influenza.

The object of this communication is to indicate briefly those experiments which should be made to solve definitely the influenza problem, avoiding waste of labour and expenses.

I. *Influenza cannot be considered as a bacteriaemia.*

It appears superfluous to digress on the importance of the so-called Pfeiffer's bacillus as an effective cause of influenza, especially because the majority of the bacteriologists in England and in America hold the opinion that Pfeiffer's bacillus has no right to be called the bacillus of influenza. Reputable German bacteriologists adhered to this conception, probably owing to national considerations principally, some German bacteriologists, however, still attribute importance to Pfeiffer's bacillus in a causal relationship.

In view of the facts, that no one of the cultured bacteria

could be considered as the agent of influenza and that this disease nevertheless shows so much the character of an infectious disease, publications might be expected contending that the germ of influenza should be looked for amongst the filterable class, so much the more because the same argument is used for infectious diseases like scarlet fever, measles, mumps and encephalitis in man and for Borna's disease in horses and for distemper in dogs: all diseases of which the real cause is still veiled.

Nicolle and Lebailly took the initiative by making experiments with filtered saliva of patients suffering from influenza, Yamanouchi, Sakakami and Iwashima in Japan, and Gibson, Bowman and Conner and others in America have followed with volunteers and chimpanzees. A definite proof, however, that the virus is filterable could not be obtained. Kruse, Friedberger Konitzer and Selten in Germany did not succeed, in infecting students and medical men (with exudation or fluid from the lungs) and in producing a typical influenza.

Certainly I would not exclude the possibility of causing morbid conditions resembling influenza through filtered toxins in men and in monkeys under favourable circumstances. It is not admissible, however, to see in these few facts a proof that the disease is really due to a filterable virus. It will be explained later that the causation of the signs and symptoms of this disease is to be attributed to entirely different conditions.

The hypothesis that influenza is caused by a filterable virus is disproved by the following epidemiological and clinical observations:

- 1° In large families often a single case only occurs.
- 2° Doctors and nurses often remain immune although they come in close contact with sufferers.
- 3° In large hospitals in the temperate zone the incidence amongst nurses exposed to infection through contact with sufferers is much lower than amongst nurses not exposed to influenza patients.
- 4° In institutions complying with the strictest hygienic requirements as regards dimensions, ventilation, lighting (sunlight), and protection against inclement weather, influenza appeared only tardily and its progress was rather slow.
- 5° Babies fed by mothers suffering from influenza are

as a rule not infected (Marfan, Chauffart, Menetier). The same fact holds good for foals, fed by mares affected by influenza. (Private observation).

6° It has been observed, that sufferers from tuberculosis are seldom attacked by a serious type of influenza. Similarly freedom from attack has been observed in diseases of children, such as scarlet fever, measles, whooping-cough and diphtheria, all infectious diseases, connected with streptococci.

7° Persons recently recovered from a streptococcal infection are immune against influenza. Young horses which had been suffering from nasal or laryngeal catarrh when out at grass were not attacked with influenza when interned in the remount depot. (Private observation).

8° In England and in America statistics have proved that soldiers and children who were treated with antidiplo-(pneumo-)streptococci vaccines did not contract influenza, or only did so in a slight degree (this in accordance with similar experiences with horses treated with the same vaccine).

These arguments may suffice, though their number could be increased easily.

For all these reasons it will be difficult to hold that the aetiological agent of influenza is a filterable virus. This word is nothing but a veiled expression for the mystery covering the influenza problem.

II. *Influenza is a real toxinaemia.*

Mystery has reigned for decades concerning the nature of the real influenza in horses, a mystery which is analogous to that concerning human influenza. No exact views exist with regard to this serious disease in horses; therefore different names, such as influenza pectoralis, contagious pleuropneumonia, Brustseuche (German) etc. are given to this disease. These different names specify a lesion of the thoracic organs. But the change in the thoracic organs is not related to the symptomatology of the so-called pleuropneumonia, any more than pneumonia invariably appears in the normal course of human influenza, measles, scarlatina, whooping cough, diphtheria, or other infectious diseases.

In the different human maladies just mentioned it is not unusual to see some pulmonary complication in addition to the

usual causes of death. This is true in the so-called pleuropneumonia of the horse. The pulmonary and pleural changes are only secondary; thus it is unreasonable to designate the disease by the names of the complications which may occur, as is nevertheless done in many cases.

People have always been interested in the secondary pulmonary lesions which are considered as specific. That is the reason, I believe, why, although eminent bacteriologists, R. von Ostertag, Robert Koch, Gaffky, Lührs and others, have concerned themselves during many years with the question, they have arrived at only unsatisfactory results. Clinicians have always named, described and treated influenza in horses according to the symptoms or complications which they observe. Every microbiologist has looked for a microbe. In the case of intestinal disorder, sometimes the thoracic organs, and then most often the lungs, but sometimes the pleura, the heart or the pericardium, were secondarily affected, either separately or at the same time; and although some cutaneous or cerebral symptoms were manifested, different names were given and different pathogeneses were attributed to the affection, but its exact nature was misconceived. From this misconception originated the idea that a pulmonary inflammation belonged to the symptomatic picture of the disease. In cases in which pulmonary inflammation was lacking, the affection was quite simply considered as averted, or it was even likened to typhoid fever (Pink eye). The real nature of the so-called pleuropneumonia in the horse is an acute upper-respiratory affection.

After working in the laboratory for many years, relying on bacteriological and serological research, on the results of experimental infections, and on preparing sera against diplo-(strepto-)cocci and bipolar bacilli, to which the secondary complications are attributable, I had the opportunity of studying influenza epidemiologically and clinically, by remaining at the remount depot, where since its foundation in 1886 influenza appears every year among the young remounts. It is known that equine influenza is especially prevalent among young horses. This is notably the case when a large number of young horses (of two or three years) are lodged in crowded stables, leaving much to be desired from a hygienic point of view. This sudden aggregation of strange horses is observed at the time

of mobilisation. In Holland the disease appeared as early as August 1st., 1914, among the horses of many of the troops of the field army, and it raged regularly in the depots. The total number of cases I observed was about 1000.

In 1916 I proposed, in a preliminary communication, to speak of influenza (grippe) of the horse instead of using the term contagious pleuropneumonia. I did this to avoid further confusion. Since that time I have published a number of communication relative to the nature of influenza in men and in horses, which have appeared in home and foreign veterinary and medical periodicals. After I acquired the certainty that distemper in the dog is also absolutely identical with human and equine influenza, I collected these communications in a compilation entitled: „Vergleichende Untersuchungen über das Wesen der Grippe des Menschen, der sog. Brustseuche (Grippe) des Pferdes und der Staupe (Grippe) des Hundes“, published in *Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere*, von O. Lubarsch, R. von Ostertag und W. Frei, 1932, Bd. XXVI. In this monograph I proved irrefutably that symptomatically influenza in the horse and distemper in the dog, whether quite normally or imperfectly developed, or with complications, are absolutely identical with human influenza.

All clinical signs and symptoms point decidedly to the interpretation that the toxins formed in the diseased system are responsible for these manifestations. With influenza in man and in animals we have to deal not with a general but with a local infection, causing the general intoxication.

The action of these toxins is specific: they are neurotoxins. It is no haematogenic infection. The characteristic tendency to haemorrhages caused by disturbances of the circulation, such as the petechiae of the mucosa of the respiratory tract, of the lungs, the brain, the skin, the eyes etc., is a result of the direct toxic irritation of the sympathetic system controlling the vaso-motor nerves.

From the many mentioned arguments it may be concluded that toxic diplo-streptococci are primarily the agents producing uncomplicated influenza in man and in animals and secondarily the producers of the complications of the lungs and other organs.

Regarding the method of infection, the same principles can be traced in human and equine influenza. It must always be remembered that the infection of horses often progresses in a very strange manner. Thus at the remount depot months sometimes passed before influenza made its appearance, in a stable situated between others where the affection raged intensely. Moreover, the malady did not become extended to the horses of farmers near the depot, and yet a very large number brought fodder and feed there every day.

We also know that it has not been possible to transmit the disease experimentally. Likewise infecting a stable, by introducing some sick animals there, has not succeeded at all. But as to this subject I have noticed a very remarkable fact. A sick horse with severe complications is placed in a stable where no case has been observed. The horses quartered in this stable remain well. A few months later, when the depot no longer contains a single sick horse, a case of influenza is found in one of these non-receptive horses, soon followed by many other cases.

As for the treatment, it is useful to emphasise the excellent effects of Neosalvarsan. Thanks to this product, the disease has almost always a short and benign course, but its use, even very early, does not prevent the spread of the disease. These observations show clearly that influenza in horses is of an autochthonous nature. It may be provoked. For this it is enough to assemble young horses of $\pm 2\frac{1}{2}$ years, purchased from breeders, with whom they have never shown signs of illness, in a stable, ignoring all hygienic conditions, especially lighting, aeration, ventilation, orientations etc., with some old horses very healthy for many years.

In connection with the fact that equine influenza is of an autochthonous nature, and that Wolff, in the „Sammelwerk der Influenza Epidemie 1989—91“, edited by the Verein für innere Medizin (Berlin), proves concerning the character of the local influenza enzootics that they are also of autochthonal origin, I showed, adducing many reasons, that *the appearance of human and equine influenza must be due to an originally commensal streptococcal infection, through transferred infection changed into parasitic diplococcal infection.*

In 1914 I brought again to the fore (Nederl. Tijdschr. voor

Geneesk.) the significance of the commensal streptococci for the appearance of infectious diseases in men and in animals.

III. *The part played by commensal streptococcus-infection.*

The question whether a case of commensal infection can constitute the starting point for parasitic infection, in other words, whether the lighting up of an En- or Epizootic, can originate from a spontaneously developed and hence a sporadic case, must be answered in the affirmative. Numerous experimental and other observations made by Theobald Smith, Nicolle, Grenier, Freund, Okamoto, Heubner, Stillman, Schmidt—Weyland and Költzsch, and others, undoubtedly show quite definitely that a commensal may become transformed into a parasitic infection. It may with certainty be affirmed that commensal streptococcus-infection as the result of growth in virulence, in a host whose resisting powers have become weakened, may assume the form of a parasitic Diplococcus-infection. Greatly increased virulence converts commensal Streptococci into typical producers of epidemic disease.

That the changes of occurrence of sporadic Streptococcus-infection, are enhanced, in the case of a member of a densely aggregated community, is proved by the frequency of occurrence of commensal Streptococcus-infections among inmates of hospitals, prisons, training ships and other institutions, just as is the case with horses in crowded military or civilian stables, and with dogs gathered together in kennels or at shows.

Moreover, I call to mind the serious epidemic Streptococcus-infections among black workers in the Transvaal mines, and those engaged in constructing the Panama Canal, or (again) railways in the Cameroons, among negroes from the Senegal and among American soldiers taken from their home surroundings and plunged into the World war in France. Over and over again the newly arriving individuals were infected, by those who had been longer exposed and had become germ carriers and acquired for themselves some degree of immunity. From the fact, that so many commensals took advantage of weakened resistance in their host, it would appear that the commensal condition represents an equilibrium between infecting capacity in the microbe and reactionary strength on the

host's part: perhaps the outcome of continuous strife in which the host endeavours to free itself from its commensals.

In the same way that blacks and those from distant lands suffered, so the young 2½—3 year old Irish and Australian horses proved unable to resist infection.

Van Loghem first pointed out that mutability is more marked in saprophytes and commensals than in parasites. It has been seen above that the mutability of the commensal *Streptococci* is very remarkable. In parasitic infections of man and animals, fluctuations in virulence occur which can be compared with those observed in the laboratory. Diphtheria, Variola (major and minor), Plague (bubonic and pneumonic), Foot and Mouth disease and other epidemics represent a *Genius Epidemicus*. Hence variations in the extent of „commensal *Streptococcus virulence*” must clearly not be ignored. As contrasted with parasitic infection, commensal *Streptococcus*-infection can only eventuate when the host's resistance is overcome by some additional factor. In commensal *Streptococcus*-infection this last named factor is of primary importance.

According to my observations one of the most important causes of susceptibility to Diplo- (*Strepto*-)cocci is entire absence from the invaded organism of protective substances against these bacteria. Beyond all doubt occasional absence of such protective substances, when resistance is in any way weakened, promotes Mutation of commensal avirulent *Streptococci* into toxin-forming Diplo- (*Strepto*-)cocci. All the epidemiological and clinical observations made upon influenza in men and in horses are exactly in line with these views.

Observations made in scattered and isolated communities throw much light on the existence of Commensalism and commensal virulence. It is known that during the period of isolation a sporadic case of a person with a mild attack of influenza is not likely to transmit the infection to his neighbours. After the arrival of the first boat of the shipping season an explosive epidemic becomes hardly avoidable. Infection still follows even if there be no case among that ship's crew. They harbour toxic (haemolytic) Diplo- (*Strepto*-)cocci, without manifesting illness, the inhabitants of Longyear City are without exception susceptible to these bacteria. They recover, as Paul and Freese show, completely, without any one of them harbouring after such

recovery the toxic Diplo- (Strepto-)cocci. As soon as they are freed from these bacteria they lose their immunity (antibodies against Streptococci) and are again susceptible, as was the case originally. When they again come in touch with a new ship's crew a fresh outbreak of influenza is likely to occur. In our more crowded communities we are never free from Streptococci. If an individual becomes momentarily free, he is soon, again, a host against his will. This disadvantage has the advantage that from these repeated happenings lasting immunity at length develops. This is the reason why persons living in temperate zones are less liable to attack than persons living in isolated or tropical zones, where influenza may not have been epidemic for many years. If influenza breaks out in these last named zones, then it spreads widely. In 1918—19 four-fifths of the population of Samoya died, because they had not developed complete immunity against influenza by repeated attacks.

This heightened resistance is the outcome, as I have shown in the case of horses, of development of antibodies against streptococci, which persist in the case of the horse for long periods. It is thanks to such persistence of antibodies that doctors and nurses remain immune, although they come in close contact with influenza patients. None of the inhabitants of Longyear City, on the other hand, possess, as it were by force of habit, heightened resistance. That such is, moreover, the case, as regards Influenza in Spitsbergen, is proved by the results obtained by Paul and Freese, who showed that haemolytic streptococci were virtually absent in the Spitsbergen population.

IV. *The Influenza in ferrets is certainly not due to a filterable virus.*

In „The Times” (Feb., 1923) it was pointed out that Distemper in Dogs causes every year great pecuniary loss, as well as anxiety and trouble to the owners of the animals; fortunately for the dogs themselves, enquiry shows that this epidemic disease presents certain resemblances, from an epidemiological point of view, to human influenza; a fact which has caused special attention to be devoted to the study of

Distemper, in the hope that such study may throw light upon Influenza in man; and thus in 1923 the „Medical Research Council“ entered upon a course of investigation, and Doctors Laidlaw and Dunkin, acting for the Scientific Committee of „The Field“ Distemper Fund Council, became associated with the work (carried on at Rhodes Farm, Mill Hill, near London) of trying to discover the cause of Distemper and Influenza, and the conclusion was reached that the cause of Distemper is a filter-passing virus. In my opinion this conclusion is not correct. Just as in human influenza, so in the case of dog distemper, the ultravisibility of the virus serves merely as a cloak veiling the mystery of the disease.

As the result of the numerous attempts made to transmit distemper artificially to healthy non-immunised dogs, it is clear that distemper is not a real bacteriaemia. The way in which infection is transmitted in dog distemper, human influenza and influenza in horses is very peculiar. Every year, particularly in large towns, hundreds of dogs, sicken without any apparent cause, while others remain unaffected despite subjection to many risks of being infected.

Laidlaw and Dunkin sought to infect animals other than dogs. As the dog is a beast of prey, they experimented upon other small beasts of prey. The ferret was readily infected with dog distemper. In the Zentralbl. f. Bact. Org. 118 (1930) appeared my paper on the nature of dog-distemper. I have there clearly demonstrated that the true disease-picture of distemper (as also of equine influenza and of human influenza) is an acute upper-respiratory affection; furthermore, that *dog distemper and human and equine influenza must be incorporated in a group of diseases caused by an original commensal streptococcus-infection, which by transfer of infection becomes changed into a diplococcal-infection*; the toxins of these diplococci in the throat causing the symptoms of influenza.

If the powers of resistance of the dog be weakened in any way a commensal streptococcus-infection may result. The overpowering of the natural resistance with weakening of the dog is thus the first cause, the power for attack by the commensal microbes the second cause. For the outbreak and development of the disease there must be both these favouring and precedent influences.

Among primary influences from without, which overpower the resistance of the dog and permit the commensal Streptococci to develop their ability to cause injury, the following play a chief part: highly selective breeding; insufficient nourishment; loss of blood, e.g. from clipping the ears and tail; exposure to cold (from unaccustomed bathing and washing, heavy rain, damp bedding); pampering teething; exhaustion caused by intestinal worms (round- and tapeworms) etc.

As is known, puppies during suckling (up to about 8 weeks old) as a rule are not attacked. The mother's milk, as in the case of children, acts by its germ-destroying powers, which may protect puppies even some time after weaning. Soon afterwards, however, the small number of antibodies against streptococci in the organism of the puppy becomes exhausted, and in the resulting negative phase commensal streptococci may become virulent. Gradually the young dog commences the battle with its commensal microbes. Distemper, then, is usually a disease affecting young dogs; it may be said that the teething period — from 3—8 months — is the time of greatest danger. As the result of reiterated slight catarrhal Streptococcal infections (e.g. in street dogs) there is developed a streptococcus immunity which protects against further infection. On the other hand, wellbred dogs are the chief sufferers. They may as puppies be bought before the end of suckling and carefully protected from association with strange dogs. Just as with negroes, inhabitants of distant lands and Irish remount-horses, young dogs of the choicest breeds are not in a position to develop resistance to commensal streptococcus-infection. Consequently they are apt to lack adequate protection by antibodies against streptococci. At every dogshow it is the costly young dogs (exposed to their older comrades, who serve as germ-carriers and themselves already possess a certain immunity against streptococci and hence against distemper) that are infected and often succumb to this disease. Veterinary examination, which submits dogs going to shows to careful scrutiny, is unable to circumvent the commensal streptococci.

The experiments I have made show that my views regarding the aetiology of distemper are correct. I was never able, after inoculating with increasing doses of polyvalent diplo-streptococci my own young dogs (which remained healthy),

either by contact or by artificial means, to infect them with distemper.

Here then is presumably the explanation of the results of the investigations made regarding ferrets by Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw. It cannot be denied, having in view the toxic character of the filtrates of throat-washings from human cases diagnosed as influenza, as well as of the filtrate from an emulsion of lung tissue from a fatal case influenzal pneumonia (which also produced the ferret disease) that toxins of diplo-(pneumo-)streptococci were there present. These are the toxins which, as matter of first instance, produced a commensal streptococcus-infection in the ferrets. The toxins (of these commensal streptococci converted into diplococci) circulating in the blood then produced the influenza symptoms. Confirmatory evidence is furnished by the pathologico-anatomical findings in the ferrets. The susceptibility as regards streptococci is developed when no antibodies against streptococci are present, or if a pre-existent small number of antibodies has become exhausted.

In the Remount Depot, by methodically taking the temperatures of all the horses, morning and evening, I have been able to observe that influenza cases developed in which the body-temperature, after suddenly rising to 41° C., returned a few hours later to normal. In my opinion infection was called to a halt by presence in the blood of antibodies against Streptococci is exhausted. In horses my findings, respecting agglutination and complement fixation tests, supply considerations of interest as regards the causation of Influenza. By extension of such blood-serum examinations light may similarly be thrown upon the aetiology of distemper. The clinical symptoms,, as well as the observations on active immunity and toxin neutralisation, made by Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw on ferrets are exactly in line with my views on the aetiology of distemper.

Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw found that influenza could be transmitted by contact from a sick to a healthy ferret. At this point therefore the work was transferred to the institute's farm laboratories at Mill Hill, where it could be carried out under the conditions of rigid isolation of individual experi-

mental animals evolved and used by Dunkin and Laidlaw in their work on dog distemper. In accordance with the opinion of these scientists it is essential, when employing ferrets as experimental animals, that all purchased animals be quarantined for 14 days before being brought into use. If this precaution be omitted it is probable *that latent distemper infection will, sooner, or later, give rise to serious confusion*. So there is no doubt that quite logically ferrets can contract distemper from the dog. It is clear that rigid isolation cannot exclude the appearance of a commensal streptococcus-infection. There exists no relationship between quarantine and such a type of infection. Only after reduction of the power of resistance of the host can infection with commensal streptococci be expected. The weakened resistance of the host must be considered as the primary aetiological cause of this type of infection; on the other hand, the aggressive capacity of the specific microbe is the primary cause of the parasitic infection. It has been proved that the mutation of the commensal streptococci into toxin-producing diplococci is connected with the temporary reduction of the resistance caused by the absence of streptococcus-immune-bodies.

Experiments of Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw have shown that there exists a considerable variation as regards both the temperature response and the intensity and time of appearance of the local symptoms. In a few ferrets typical diphasic temperature responses have occurred without any nasal symptoms, and in one case well-marked symptoms were noted without any elevation of temperature. These animals when tested later were found to be immune. Occasionally a ferret, a short time after recovery, has had a relapse in which the temperature course and the symptoms have been similar to those of the primary illness. These variations observed with ferrets exhibit a clear resemblance to those occurring in man. Thanks to regularly taking the temperature (three times a day) of all the horses present in the remount depot I stated similar facts during an epidemic of equine influenza.

These variations can be explained by the presumption that the amount of immune bodies is restricted; the results of my own experiments of serological blood examinations greatly support this hypothesis.

It ought not be denied that filtrates of throat-washings obtained from influenza patients as early as possible after the onset of definitive symptoms will probably contain toxins, and may produce a commensal streptococcus-infection in ferrets. (A similar filtrate collected from four healthy persons had no action whatever). My hypothesis, that the toxins produced by diplococci transmuted from commensal streptococci, must be made responsible for the symptoms of influenza, could be proved in the following manner.

Experiments fit to solve the problem of the aetiology of influenza.

I found that young dogs which had always been thoroughly healthy were immune to distemper even if exposed to repeated infections, if they were treated beforehand with increasing doses of polyvalent streptococcus-vaccine. Taking in consideration this fact and my views on the results of the research work of Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw, it will be found that non-immune ferrets cannot be infected by a filtrate of throat-washings of influenza patients under the condition, that the animals be at the same time treated *by subcutaneous injections of polyvalent diplococcus serum*. Even greater certainty might be obtained if the ferrets were treated *beforehand by polyvalent anti-streptococcus vaccine*.

I feel quite sure that the same evidence could be obtained with young dogs. Supposing that:

1° the Dick reaction be positive (applied on the hairless and unpigmented skin of the lower abdomen) and that

2° the agglutination and the complement fixation tests have given a negative result,
it may be accepted undoubtedly that in the organism of these dogs antibodies against streptococci are absent. In this case the same experiments as those mentioned for ferrets could be carried out, and by these means it could be proved that *influenza in man and in ferrets and the distemper in dogs are essentially the same disease*.

It is possible that a few ferrets may prove to be immune if subjected to the experiments of Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw, but in these cases it will be shown by serological tests that this immunity depends upon the presence of anti-streptococcus immune bodies.

Similar serological experiments will prove that the following facts are due to the presence of antibodies against streptococci in the blood:

1° Ferrets recovered from influenza are immune to new infection;

2° The serum of such ferrets neutralises an emulsion of influenza toxins;

3° The serum of human patients reconvalescent from influenza neutralises the toxin of the so-called influenza of ferrets.

Shope¹⁾ states that the pig is also subject to influenza. This may be true considering that a similar affection characterised by a catarrhal inflammation of the respiratory tract has been observed in cats, foxes and various other animals, which are susceptible to streptococci.

Therefore there is no doubt in my mind that Shope will obtain the same results with pigs if he carries out similar serological tests and experimental injections as have been mentioned for ferrets and dogs.

As already stated, my arguments show that the toxic Diplo-(Strepto-)cocci have specific and important significance in human, equine and dog Influenza. As I have said, the peculiar injuriousness in these diseases is attributable not so much to the Diplococcus as to the soluble toxin it fabricates. This is the cause of the symptoms we observe. Hence employment of Influenza-, Brustseuche- and Distemper-diplococci, to produce experimentally Influenza in man, Brustseuche in the horse and Distemper in the dog, will never satisfy, with any consistency, the requirement laid down by Robert Koch as demonstrating the cause of infection. *It is not possible to explain these epidemic diseases on purely bacteriological lines.*

Direct proof by experiment upon animals, that virulent commensal Streptococci have causal significance for these identical infectious diseases, presents difficulties as has been shown by the Dicks in the case of Scarlet Fever. Their transfer sets up purulent processes and sepsis. I recall the fact, that the

¹⁾ Shope, R.: Jour. Exp. Med., 1931, liv., 349; Lewis, P.A., and Shope, R.: Ibid., p. 361; Shope, R.: Ibid., p. 373; same author: Ibid., 1932, liv., 575.

Pneumococcus (Fränkel—Weichselbaum—Schütz) has causal significance for croupous pneumonia in man and in the horse (which no one questions nowadays) is in like manner difficult to demonstrate.

Experiments producing influenza in man, Brustseuche in the horse and distemper in the dog, can only be carried into effect after it has been shown, for man, horse and dog, by properly executed agglutination or complement fixation tests, that their blood contains no immune bodies against streptococci.

Beyond all doubt, occasional absence of such protective substances in the organism, when its powers of resistance have in any way become weakened, indicates a mutation of commensal avirulent streptococci into toxin-forming Diplo-(Strepto-)cocci. In my opinion the possibility of further advance in study of these questions lies in exploring my view respecting the relation of the significance of a specific Diplo-(Strepto-)coccal toxin in setting up disease processes in human Influenza, the so-called Brustseuche (Influenza) of the horse and the Distemper (Influenza) of the dog.

Reasons why there are not cross infections between human and equine influenza.

It seems remarkable that there exist no cross infections from man to horse or horse to man of this identical disease. If relationship has been established, I believe that this must be due to accidental circumstances. Medical men noted during epidemics of human influenza in 1758 and 1775 many horses were affected with colds and coughs. Again preceding the great epidemic in England in 1889—90 influenza prevailed among horses, and Dr. E. Symes Thompson was so strongly impressed with the intimate connection between equine and human influenza that, in December 1889, he wrote to the *British Medical Journal* calling attention to the prevalence of the equine epizootic, and suggested that it would not improbably prove the forerunner of an outbreak in man; but no such relationship was established. My experience at the remount depot has been that no cases of influenza have developed among men attending cases of equine influenza. The inference, that for these reasons they are essentially distinct diseases, is absolutely incorrect. I

refuted undoubtedly the argument that influenza is observed only in man.

As is known, the Streptococci cause a whole series of pathological and (according to their localisation) of clinical symptoms and pathologico-anatomical changes. In accordance with their differing operation, the difference in their virulence in different animals is likewise of importance. There are strains of Streptococci very infectious to mice and which likewise possess high pathogenicity for rabbits; but the opposite condition of things is also encountered. Similar observations have been made as regards passage through animals. Increased virulence is not equally observed on passage through mice and rabbits. In different cases there are differing results. Cultures, which on passage from rabbit to rabbit become very virulent for this species, lose their virulence for mice, and conversely. A directly weakening influence as regards virulence for man is caused by passage through mice or rabbits. Marmorek when producing his Streptococcus-serum used a strain very deadly for rabbits and not pathogenic for man. Koch and Petrusky were not able to infect various persons, even with great quantities of their cultures highly virulent to rabbits. Similar results were obtained by Kocher and Tavel. By continued animal passage streptococci harmful to animals do not become pathogenic for man. We know that our larger domestic animals are little susceptible to strains pathogenic for man. Streptococcus strains highly virulent for man may have little or no effect upon the horse. This is accounted for by the presence in horse blood of antibodies against Streptococci, which, as already mentioned, persist in the blood of horses that have suffered from influenza. This is associated with the high toxicity of the protective diplococci of the horse. In man the protective material disappears much more quickly. As I have shown, the clinical results, which in different infectious diseases have been obtained with so-called normal horse serum, are due exclusively to the protective antibodies against Streptococci present in this material. The results of my Agglutination and Complement fixation experiments confirm this. The above reasons explain, I think, why cross infection from horse to man and man to horse need not ordinarily occur.

PUBLICATIONS RELATIVE TO THE INFLUENZA-PROBLEM OF MEN,
HORSES AND DOGS BY THE AUTHOR.

- 1 L'étiologie et la thérapie de la fièvre typhoïde (Pferdestaupe, Influenza catarrhalis). Zentralbl. f. Bakt., Abt. Orig., Bd. 68, H. 1.
 2. Salvarsan-inspuitingen bij remonte paarden, gedurende de „borstziekte” enzootie 1911/12 te Milligen. Tijdschr. v. Diergeneesk. 1912.
 3. De „Influenza” ziekten bij het paard. Monographie, 1914.
 4. De l'étiologie de la typhose équine (Brustseuche) et de son ingén. de de Méd. vét. 1914.
 5. De beteekenis en de bestrijding der streptokokken en hunne stofwisselings producten bij verschillende besmettelijke ziekten van mensch en dier. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1914, Nr. 1.
 6. Het wezen, de besmettelijkheid en de maatregelen ter bestrijding van de „Griep” van het paard. Tijdschr. voor Diergeneesk. 1915, Afl. 24; ebenda 1916, Afl. 1.
 7. De Griep en hare bestrijding. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1919, Nr. 2.
 8. Neosalvarsan en Griep. Tijdschr. v. Geneesk., 10 Mei 1919.
 9. De „besmettelijkheid” van de Influenza. Tijdschr. v. Geneesk., 20 September 1919.
 10. Over de „beschuttende” en „therapeutische” werking van neosalvarsan bij „Griep”. Tijdschr. v. Diergeneesk., 15 Maart 1920.
 11. Griep en Tuberculose. Tijdschr. v. Vergelijkende Geneesk. 1920.
 12. De aetiologie van de Griep. Tijdschr. v. Diergeneesk. 1920.
 13. Etude comparée sur la Grippe humaine et l'affection typhose (grippe) équine. Revue gén. de Méd. vét., 15. juillet 1921.
 14. De vaccino-pyo-thérapie bij de z.g. borstziekte van het paard. Tijdschr. v. Diergeneesk. 1924, Afl. 6.
 15. La vaccino-pyo-thérapie dans l'affection naso-pharyngienne, dont dérive la typhose (grippe) du cheval. Rev. de Méd. vét. 1924, Nr. 20.
 16. Der klinische Symptomenkomplex der sogenannten Brustseuche des Pferdes und deren Identität mit der Grippe des Menschen. Ztschr. f. Veterinärk. 1924, H. 9; 1925, H. 1—2.
- La valeur réelle des expérimentations concernant le soi-disant virus filtrant de la grippe humaine. Rev. de Patholog. Comp., 5. mars 1926.
- Le rôle du coccobacille de Pfeiffer dans la grippe humaine. Rev. de Patholog. Comp., 5. mai 1926.
- La cause essentielle de la pneumonie contagieuse. Revue de Pathologie Comp., 8^e juin 1926.
- La Cause primaire de la grippe humaine. Rev. de Patholog. Comp., 5.—20. août 1926.
21. Sur la transformation des streptocoques, etc. Rev. de Patholog. Comp., 5. déc. 1926.

22. De Verwekker van de influenza (griep) van den mensch en van de eigenlijke influenza (de z.g. borstziekte) van het paard. Geneesk. Gids 1927, Afl. 7—8.
 23. Sur la classification des „affections typhoides” (Influenza) du cheval. Rec. de méd. vét. 1928, Nr. 10.
 24. Das Wesen der Hundestaupe (influenza). Zentralbl. f. Bakt. usw. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 118.
 25. Die „kommensale” Infektion; ihre Rolle bei ansteckenden Krankheiten, deren bacteriologie noch ungeklärt ist (Grippe, Brustseuche und Hundestaupe). Berl. tierärztl. Wschr. 1930, Nr. 39.
 26. Die vollständige Lösung der allgemein bestehenden chaotischen Verwirrung der als „Influenza” bezeichneten Infektionskrankheiten, der Pferde. Berl. tierärztl. Wschr. 1931, Nr. 47.
 27. Vergleichende Untersuchungen über das Wesen der Grippe des Menschen, der sog. Brustseuche (Grippe) des Pferdes und der Staupe (Grippe) des Hundes. Ergebnisse d. Allg. Pathol. und Path. Anatomie des Menschen u. des Tieres, von O. Lubarsch, R. von Ostertag und W. Frei, 1932, Bd. XXVI.
 28. Die Grippe, ihr Wesen und ihre Bekämpfung. Schweiz. med. Wschr. 1933, Nr. 28.
-

Reiniging en Concentratie van Diphtherietoxine en -anatoxine VII

DOOR

Dr. A. C. BRANDWIJK en Dr. A. TASMAN.

In vorige verhandelingen 1) werden de zuivering en concentratie van diphtherie-anatoxine met behulp van ammoniumsulfaat uitvoerig besproken. Ons restte nu nog na te gaan of de immuniseerende werking van het op deze wijze gezuiverde product gelijkwaardig was aan die van het ongezuiverde anatoxine.

Daartoe werden twee anatoxinen op de vroeger beschreven wijze gereinigd, n.l.: Anatoxine No. 277 ($AW = 14$, Tot. $N = 0.326$, Rest $N = 0.324$, Eiwit $N = 0.002 \frac{AW}{N} = 43$) en Anatoxine No. 259 ($AW = 17\frac{1}{2}$, Tot. $N = 0.258$, Rest $N = 0.225$, Eiwit $N = 0.033$, $\frac{AW}{N} = 68$). De gezuiverde producten werden genoemd resp. No. 277 A ($AW = 38$, Tot. $N = 0.031$, $\frac{AW}{N} = 1226$, $RF = 28$) en No. 259 A ($AW = 76$, Tot. $N = 0.104$, $\frac{AW}{N} = 731$, $RF = 11$). Opvallend is hier weer het verschil in reinigingsfactor van de beide gezuiverde producten. Anatoxine No. 277, met een zeer laag eiwit-N-gehalte, geeft een aanmerkelijk hogere RF dan anatoxine No. 259, met een betrekkelijk hoog eiwit-N-gehalte; een uitkomst die, zooals uit onze vorige publicatie blijkt, ook te verwachten was.

Van beide gezuiverde anatoxinen werd nu door verdunning met physiologische zoutoplossing een gedeelte op de oorspronkelijke A.W. en een gedeelte op tweemaal de oorspronkelijke A.W. gebracht. De immuniseerende werking van de zoo verkregen entstoffen werd vergeleken met die van de uitgangs-

producten, door middel van proeven op caviae, zooals in onderstaande tabel is aangegeven.

De caviae, behandeld met 3 injecties, werden ingespoten met resp. 0.5, 1 en 1 cm³; de tweede injectie werd gegeven drie weken na de eerste, de derde injectie twee weken na de tweede. De dieren behandeld met twee injecties, werden ingespoten met resp. 1 en 1 cm³, met een tusschenruimte van 3 weken. Na de verschillende inspuitingen vertoonden de dieren geen enkele reactie.

Groep	Product	Aantal inspuitingen	AW	Aantal dieren	† na 10 dagen
I	No. 277	3	14	51	22 = 43 %
II	" 277A	3	14	36	17 = 47 %
III	"	3	28	36	10 = 28 %
IV	"	2	28	53	15 = 28 %
V	No. 259	3	17½	47	17 = 36 %
VI	" 259A	3	17½	49	18 = 37 %
VII	"	3	35	48	16 = 34 %
VIII	"	2	35	10	2 = (20 %)

De dieren van groep I, II, III, V, VI en VII werden 4 weken na de laatste immuniseerende injectie ingespoten met 250 dlm. de dieren van groep IV en VIII ontvingen deze giftosis 6 weken na de laatste immuniseerende inspuiting ¹⁾).

¹⁾ Het nagaan van de door de immunisatie verkregen immuniteit bij de proefdieren vereischt eenige nadere toelichting. Indertijd werden door Pondman en Tasman ²⁾ immunisatieproeven met diverse „gezuiverde” anatoxinen op caviae verricht. Zij stelden zich toen tevreden met het nagaan van de verkregen *humorale* immuniteit door het antitoxinegehalte te bepalen van het door hartpunctie verkregen bloedserum. Hoewel natuurlijk op deze wijze een bepaalde indruk van de immuniseerende werking van entvloeistoffen te verkrijgen is, verdient toch de bepaling van de som van *cellulaire en humorale* immuniteit de voorkeur, daar deze som de totale immuniteit der proefdieren weergeeft. In een latere proevenreeks (niet gepubliceerd) vergeleken Pondman en Tasman dan ook op deze wijze de immuniseerende werking van met aluminumsulfaat gezuiverd anatoxine t.o.v. het ongezuiverde uitgangproduct. Zonder thans verder op deze proeven in te gaan, kan volstaan worden met de mededeeling dat, hoewel de aantallen-proefdieren hierbij kleiner waren dan bij de hierboven beschreven experimenten het geval was, het met aluminumsulfaat gezuiverde anatoxine een overeenkomstige immuniseerende werking vertoonde als het ruwe uitgangproduct.

Zooals uit de tabel blijkt, bezitten de dieren van groep I en II een gelijkwaardige immuniteit, evenzoo de dieren van groep V en VI. Groep III vertoont een sterkere immuniteit dan groep I, terwijl groep VII en groep V een gelijke immuniteit bezitten. De groepen IV en VIII toonen aan dat ook met twee injecties een zeer voldoende onvatbaarheid is te bereiken.

Wij zijn ons natuurlijk volkomen bewust van het feit, dat het gebruikte diermateriaal verre van homogeen is en bovendien de aantallen der in de verschillende groepen ondergebrachte dieren te klein zijn om een critische beschouwing van statistisch standpunt te kunnen verdragen.

De verkregen resultaten zullen dan ook ongetwijfeld met een betrekkelijk groote toevalsfactor behept zijn. Toch zijn wij van meening, dat zij de gevolgtrekking, dat de immuniseerende werking van het met ammoniumsulfaat gezuiverde anatoxine gelijkwaardig is aan die van het ongezuiverde product, rechtvaardigen.

Samenvatting.

In twee proevenreeksen werd de immuniseerende werking van met ammoniumsulfaat gezuiverd diphtherie-anatoxine vergeleken met die van het ongezuiverde uitgangproduct, door met deze entstoffen reeksen van marmotten te immuniseeren. De verkregen immuniteit werd nagegaan door de behandelde dieren gelijktijdig een zelfde hoeveelheid diphtherietoxine (250 Dlm) in te spuiten.

Uit de verkregen resultaten mag de conclusie getrokken worden dat het gezuiverde anatoxine een gelijkwaardige immuniseerende werking bezit als het ongezuiverde uitgangproduct.

LITERATUUR.

- 1) A. C. Brandwijk en A. Tasman, Ned. Tijdschr. Hyg., Microbiol. en Serol. 7, 283 (1933); 8, 94 (1934); Leeuwenhoek 1, 1 (1934); Z. Immf. Exp. Ther. 77 390 (1932); 78, 540 (1933); 81, 137 (1933).
- 2) A. B. F. A. Pondman en A. Tasman, Ned. Tijdschr. Hyg., Microbiol. en Serol. 7, 39 (1933); Z. Immf. Exp. Ther. 73, 118 (1931).

Boekaankondiging.

Dr. E. D. Baumann, Drie opstellen over Volksgeneeskunde, uitgever Eigen Volk, Scheveningen, 1934; blz. 47; prijs f0.60.

Hoewel dit geschrift feitelijk geen verband houdt met den inhoud van dit tijdschrift, dachten wij toch goed te doen met de aandacht der lezers erop te vestigen. Het is onderhoudend, bovendien zeker merkwaardig van inhoud, omdat het tracht licht te werpen op de vorming van voorstellingen en begrippen, welke den mensch ten slotte tot de moderne geneeskunde hebben gevoerd.

Het is natuurlijk onmogelijk, op directe gegevens steunend, dien ontwikkelingsgang met zekerheid te schetsen, de eenige methode, welke daarbij ten dienste staat, is op grond van de observatie van nog levende, zoogenaamde primitieve volken en volksstammen tot een bepaald beeld daarvan te geraken. Hierbij is echter te bedenken, dat die primitieven reeds een langdurige geschiedenis doormaakten, bovendien, dat niet overal de denkbeelden en opvattingen zich op gelijke wijze hebben ontwikkeld.

Toch blijkt de geheel op deductie berustende methodiek tot verrassende resultaten te leiden, welke een verklaring zouden kunnen geven van overigens onbegrepen, zelfs onverklaarbare denkbeelden.

Het boekje bevat drie opstellen, getiteld: Primitieve opvatting over lijf en leven; De bok en de geit in de volksgeneeskunde; De dood door den bliksem in volksgeloof en wetenschap.

de G.

Professor Dr. D. A. de Jong-Stichting.

In de laatste gehouden vergadering van beheerders is besloten een onderzoek te doen instellen naar den z.g. „filtreer-baren vorm” van den tuberkelbacil.

Bedoeld onderzoek zal geschieden in het laboratorium van Prof. W. C. de Graaff te Utrecht, waarbij Dr. P. Schlemper, die zich in het afgelopen jaar gedurende eenige maanden aan het Instituut Pasteur te Parijs van de daar gevolgde werkwijze op de hoogte heeft gesteld, de uitvoering op zich heeft genomen.

Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie,

gehouden Zaterdag 11 Mei 1935, voorm. 10.15 uur, in het
Gemeente Ziekenhuis aan den Coolsingel
te Rotterdam.

De voorzitter, *Prof. Flu*, opent de vergadering, die wordt bijgewoond door 41 leden en 5 gasten, met een woord van welkom tot de aanwezigen. Vervolgens herdenkt hij de sedert de laatste bijeenkomst aan de 'Vereeniging ontvallen leden *Prof. Söhngen*, die van 1922 tot 1925 tevens voorzitter is geweest, en *Dr. Massink* en verzoekt de aanwezigen door opstaan eenige oogenblikken aan hun nagedachtenis te willen wijden. Nadat hieraan is gevolg gegeven, deelt *Prof. Flu* mede, dat het dit jaar 10 jaar is geleden, dat de secretaris als zoodanig werd gekozen; hij wenscht den functionaris hiermede geluk, hetgeen door de leden met applaus wordt bekrachtigd.

De *secretaris* dankt den voorzitter voor de gesproken woorden en de vergadering voor haar bijval en verklaart zich gaarne bereid zijne werkzaamheden te blijven vervullen tot over een enkel jaar ook voor hem de tijd van aftreden zal zijn gekomen.

Ingekomen stukken.

Van de Algemr. Nederl. Vereeniging voor Sociale Geneeskunde is de uitnoodiging ontvangen tot bijwonen van hare zomervergadering, vastgesteld op Zaterdag 22 Juni a.s. te Eindhoven, met, volgens het voorloopig programma, de onderwerpen: a. Volksvoeding, b. Gezondheidszorg in de Groot-Industrie en c. T.b.c.-bestrijding in de Industrie. Aan de leden, die zulks wenschen, zal het definitief programma worden doorgezonden.

Verder is van *Prof. Palle*, namens het betreffend ondercomité van het van 2—7 September a.s. te Amsterdam te houden

Internationaal Botanisch Congres, bericht ontvangen, dat aan de Ned. Vereeniging voor Microbiologie één stem is toegekend bij de op dit congres te houden besprekingen over nomenclatuur, in verband waarmede de Vereeniging wordt uitgenoodigd een of meer afgevaardigden naar bedoeld congres te zenden.

Op verzoek van den *voorzitter* verklaart *Prof. Kluyver* zich bereid de Vereeniging te vertegenwoordigen; aan *Prof. Joha. Westerdijk*, die mede als afgevaardigde wordt aangewezen, zal van hare benoeming schriftelijk kennis worden gegeven.

Tenslotte heeft *Dr. Smit* bericht, dat zijn voor deze vergadering aangekondigde voordracht is moeten komen te vervallen.

Verslag van den secretaris.

De secretaris, *Dr. Van Nederveen*, deelt mede, dat de toestand der Vereeniging, wat het aantal leden betreft, iets gunstiger is geworden: Er zijn thans 121 gewone leden, een vooruitgang van twee vergeleken met 1934, terwijl als „temporair” lid — het sedert dit jaar ingevoerde lidmaatschap tegen lagere contributie — 4 personen zijn ingeschreven. In het afgelopen jaar werden 2 vergaderingen gehouden, die zeer goed, onderscheidenlijk door 51 en 58 personen, waren bezocht.

Het nieuwe tijdschrift der Vereeniging „Antonie van Leeuwenhoek” voldoet, naar mag worden aangenomen, aan de gestelde verwachtingen. Bij het bestuur zijn althans hierover geen opmerkingen of verdere wenschen ingekomen.

Verslag penningmeester.

Het geldelijk verslag over 1934 wordt uitgebracht door de afgetreden penningmeesteres, *Dr. De Wolff*. Dit luidt aldus:

OVERZICHT DER INKOMSTEN EN UITGAVEN OVER 1934.

Inkomsten

Saldo 1 Jan. 1934	f 2226.50
Aan contributie	„ 1190.—
Aan rente over 1934	„ 63.02

f 3479.58

Uitgaven

Van Doesburgh over 1933	f 988.54
Prof. De Jong-Stichting..	„ 50.—
Biologische Raad	„ 25.—
Onkosten secretaris	„ 34.24
Idem penningmeesteres	„ 6.80
2 vergaderingen	„ 86.73
Saldo 1 Jan. 1935	„ 2288.27

f 3479.58

BALANS PER 31 DECEMBER 1934.

<i>Bezittingen</i>		<i>Schulden</i>	
Saldo spaarbank	f 2214.02	Fa. Swets en Zeitlinger	f 900.—
Saldo postrekening	„ 74.25	Saldo bezit	„ 1388.27
	<u>f 2288.27</u>		<u>f 2288.27</u>
Saldo bezit op 31 December 1934	f 1388.27		
Saldo bezit op 31 December 1933	„ 1238.02		
		Winst over 1934	<u>f 150.25</u>

De kascommissie, bestaande uit de heeren *Den Dooren de Jong* en *Folpmers*, deelt ter vergadering mede, dat zij de boekhouding heeft nagezien en alles uitnemend in orde heeft bevonden. Op haar voorstel wordt aan *Dr. De Wolff* ontheffing verleend voor het gevoerde beheer, waarbij de voorzitter nogmaals den dank der vergadering overbrengt voor de nauwgezette wijze, waarop *Mej. De Wolff* de geldelijke belangen der Vereeniging heeft behartigd.

Begrooting voor 1935.

Deze wordt ingediend door *Dr. J. C. H. Broek*, die sedert 1 Januari het penningmeesterschap vervult. De Inkomsten en Uitgaven worden hierin geraamd als volgt:

<i>Inkomsten</i>		<i>Uitgaven</i>	
Contributie		Tijdschrift	f 910.—
121 gewone leden	f 1210.—	Prof. De Jong-Stichting..	„ 50.—
4 tempor. leden	„ 10.—	Biologische Raad	„ 25.—
Aan rente	„ 64.—	Onkosten secretaris	„ 50.—
		Idem penningmeester ..	„ 20.—
		2 Vergaderingen	„ 100.—
		Onvoorzien	„ 29.—
		Batig saldo	„ 100.—
	<u>f 1284.—</u>		<u>f 1284.—</u>

Gelet op dezen gunstigen stand der geldmiddelen, is in het dagelijksch bestuur de wenschelijkheid besproken de contributie voor het gewone lidmaatschap met f1.— te verlagen, hetgeen het toetreden van nieuwe leden zou kunnen bevorderen. Naar een op dezen grondslag opgemaakte begrooting zou het boven vermelde batig saldo verdwijnen en het bedrag voor onvoorzien van f29.— op f7.— worden teruggebracht.

Dr. Tasman merkt hierbij op, dat bij de oprichting van het

nieuwe tijdschrift de mogelijkheid is opengelaten, aan het tijdschrift verdere uitbreiding te geven, wanneer de geldmiddelen zulks zouden toelaten. Hij vestigt hierop de aandacht, hoewel hij niet weet, of voor deze uitbreiding voldoende copy beschikbaar is.

De *voorzitter* zegt toe, dit met de redactie te zullen bespreken; in de najaarsvergadering zal dit punt dan nader worden behandeld.

Najaarsvergadering.

Besloten wordt deze te houden te Leiden of te Utrecht en wel op Zaterdag 23 November a.s.

Daar bij de *Rondvraag* niemand het woord verlangt, wordt overgegaan tot het

Wetenschappelijk programma.

De eerste voordracht wordt gehouden door *Dr. P. Schlemper* over „Allotropie of Kinesis van Bacteriën”.

Naar spreker meent, is de groote hoeveelheid namen, die in de bacteriologie gebezigd wordt om veranderlijkheden aan te duiden, slechts in staat om de verwarring, die op dit gebied heerscht, nog grooter te maken. Vele termen, zooals bijv. polymorphie en pleomorphie, worden vaak door elkaar gebruikt en men verbindt daaraan de meest uiteenlopende verschillen in morphologische en physiologische eigenschappen. De letterlijke beteekenis rechtvaardigt vaak niet het begrip, dat men aan deze termen hecht. Zoo lijkt het spreker gewenscht, het begrip pleomorphie te laten varen en voor de veranderlijkheid in het algemeen de term „allotropie” in te voeren, welke een in de chemie algemeen gebruikte uitdrukking is om de chemische en physische eigenschappen van in verschillende vormen (modificaties) voorkomende elementen aan te duiden.

„Allotropie” bij bacteriën wil dan zeggen, dat bacteriën van een en dezelfde soort kunnen voorkomen in verschillende vormen, die zoowel morphologisch als physiologisch van elkaar kunnen verschillen.

De veranderlijkheid, die organismen bezitten uit hoofde hunner normale levende natuur, behoort tot de autokinesis, die welke ontstaat door andere dan de normale omstandigheden, behoort tot de heterokinesis. Deze laatste is te verdeelen in

mutatie of pleogenie en variatie of pleophaenie, welke laatste weer in tijdelijke en duurzame variatie (Dauermodification) is te onderscheiden.

Gedachtenwisseling.

Dr. Tasman, die wijst op de moeilijkheid bij een te scherpe onderscheiding van „duurzame” variatie en mutatie, zegt er principieel bezwaar tegen te hebben om het in de scheikunde scherp omschreven begrip allotropie te gebruiken voor een toch min of meer verwarrend complex van verschijnselen in de bacteriologie. B.v. het verschijnsel van een overgang als bij zwavel is bij bacteriën toch onbekend.

Spreker antwoordt, dat de duurzame variatie practisch vaak niet van de mutatie te onderkennen zal zijn; echter kan het van voordeel zijn aan deze twee verschillende begrippen vast te houden. Spr. ziet niet in, waarom men niet gerechtigd zou zijn om een begrip uit een bepaalden tak van wetenschap ook in een andere te gebruiken. Indien zulk een begrip in dien bepaalden tak van wetenschap een scherp omschreven begrip blijkt te zijn, zal dit een reden zijn om dit begrip juist wel te gebruiken. De definitie van het begrip „allotropie” is volledig van toepassing zoowel voor de doode chemische stof als voor de levende stof.

Dr. Smit maakt bezwaar tegen het beperken van variatie en mutatie tot de heterokinese en vindt daarin aanleiding om het gemaakte onderscheid tusschen autokinese en heterokinese kunstmatig en dus weinig vruchtbaar te noemen.

Spreker zegt, dat de variatie en mutatie slechts tot de heterokinese beperkt zijn, daar deze beide soorten van veranderingen ontstaan zijn onder invloed van *veranderde* omstandigheden, welke van de normale afwijken. Bij de autokinese daarentegen gaat het *alleen* om de natuurlijke, normale veranderingen, welke elk organisme bezit uithoofde van zijn *levende* natuur, b.v. de verschillende groeivormen der „cycle evolutif”. Er is dus wel degelijk groot verschil tusschen de auto- en de heterokinese.

Dr. A. Charl. Ruys behandelt „Moeilijkheden met zuurvaste saprophyten bij het kweken van tuberkelbacillen”.

Beschreven wordt een zuurvaste saprophyt, die aanvan-

kelijk door uiterlijk en groeiwijze op de voedingsbodems volgens Löwenstein voor een tuberkelbacil werd aangezien. Om den tuberculeuzen aard van een cultuur vast te stellen op de voedingsbodems van Löwenstein zal men zich eerst door overenting moeten overtuigen, dat de cultuur niet den snellen groei der saprophyten vertoont.

Bij de gedachtenwisseling vraagt *Dr. Vedder*, of het niet verstandig is, wanneer in sputum veel zuurvaste staafjes worden gevonden, naast de kweekproef ook de dierproef in te stellen, evenals bij het onderzoek van urine.

Dr. Ruys acht dezen weg wel het veiligst maar niet in alle gevallen noodzakelijk; ook om practische redenen is dit niet steeds toe te passen.

Prof. Flu zegt bij entingsproeven op caviae den indruk te hebben gekregen, dat de bacteriën zich op de voedingsbodems toch kunnen vermenigvuldigen, zonder dat hierop van groei iets te zien is.

Dr. W. Kauffmann doet daarna een „Voorloopige mededeeling over het gebruik van glutaminezuur bij het bacteriologisch wateronderzoek”.

Bij het bacteriologisch wateronderzoek gebruikt men voor het kweken van *B. coli lactose-bouillon*. De laatste jaren zijn tegen dit medium verschillende bezwaren gerezen, daar het in vele gevallen „te goed” is, zoodat vaak andere organismen, zooals de anaerobe sporevormers en *Aerob. polymyxa*, de oorzaak der gisting zijn. Vele wijzigingen zijn nu voorgesteld om dit euvel te verhelpen.

De nieuw voorgestelde voedingsbodems bestaan meestal uit lactose-bouillon, waaraan voor de sporevormers groeibelemmende stoffen zooals gal, phenol of kleurstoffen toegevoegd werden. Spreker meent, dat men hierbij een verkeerden weg volgt door een voedingsvloeistof, die eerst te goed was, dan weer slechter te maken. Logischer is het, direct een eenvoudiger medium te bereiden. Hierbij werd het eerst gedacht aan een eenvoudiger stof als stikstofbron dan de tot nu toe gebruikte bouillon en pepton en wel aan een chemisch zuivere stof, waardoor meteen de uniformiteit gewaarborgd zou zijn. De keus viel op glutaminezuur, daar dit een aminozuur is, dat

ook in bouillon voorkomt en ook wat aanschaffingsprijs betreft in aanmerking komt.

Als voedingsvloeistof werd gebruikt een oplossing van 1% lactose + 1% glutaminezuur (smp. 197—198) + 0.1% K_2HPO_4 + 0.02% $MgSO_4$. Op 1 liter voegt men 1 c.c. van een ½% alc. oplossing van broomthymolblauw toe en neutraliseert het glutaminezuur met NaOH tot neutraal.

Van de 48 stammen van de coli-aerogenesgroep groeiden 46 binnen 24 uur onder zuur- en gasvorming in dit medium. Voor 9 watermonsters werden de grenzen der gisting in dezen voedingsbodem vergeleken met die in lactose-pepton; het nieuwe medium vertoonde hierbij een kleine achterstand. In de vloeistof van positieve buizen van beide media kon *B. coli* worden aangetoond. In het lactose-natriumglutaminaat medium kunnen echter ook de anaerobe sporevormers gisting veroorzaken, zooals bleek uit entingen met zuivere culturen van *Cl. Welchii*.

Hoewel deze voedingsvloeistof dus dezelfde nadeelen heeft als lactose-bouillon of pepton, heeft het echter het voordeel, dat men hierin voor het wateronderzoek een voedingsbodem kan voorschrijven, die voor elken onderzoeker hetzelfde zal zijn.

Ook werden telplaten aangelegd in bouillongelatine en agar, en in natriumglutaminaatgelatine en agar. Hierbij bleek, dat Na-glutaminaatgelatine en agar geschikt is voor het aanleggen van telplaten, ofschoon de uitkomsten wel anders zijn dan met bouillongelatine of agar. Het voordeel van het gebruik van Na-glutaminaatgelatine of agar is, dat ook hiermede de eenheid der methode vergroot wordt.

Bij de op de voordracht volgende gedachtenwisseling beveelt *Dr. Folpmers* aan, zoowel ruw als zuiver water in het onderzoek te betrekken en liefst in verschillende jaargetijden. Zelf zal hij gaarne wat glutaminezuur voor dit doel ontvangen.

Na een opmerking over het moeilijk te verkrijgen zijn van de benodigde hoeveelheden glutaminezuur deelt *Prof. Kluyver* mede, dat dit in Japan bij de voeding wordt gebruikt en daar dus wel een verspreid product zal zijn.

Dr. Krugers Dagneaux merkt op, dat hij in verband met overeenkomstige moeilijkheden als *Dr. Kauffmann* heeft ondervonden, er toe is overgegaan de suikers weg te laten. Door toe-

passing van de indolproef met uitstrijken op Endoplaten krijgt men z.i. scherpere uitkomsten. Hij vraagt, of inleider ook onderzoekingen heeft verricht met glutaminezuur zonder suikers.

Dr. Kauffmann antwoordt ontkennend.

Dr. Smit zegt het zeer te zullen waardeeren, wanneer de waterleidingbedrijven aan de onderzoekingen van *Dr. Kauffmann* verdere uitbreiding willen geven.

De heer *C. O. Schaeffer* spreekt vervolgens over „Citraat assimileerende colibacteriën”.

Dikwijls wordt aangenomen, dat citraat assimileerende colibacteriën van niet-faecalen oorsprong zijn. Geheel juist is dit niet, want met een geschikte kweekmethode kon worden aangetoond, dat zij regelmatig in faeces voorkomen, soms zelfs in groote hoeveelheid. Worden deze organismen buiten den darm aangetroffen, zonder dat gelijktijdig citraat negatieve colibacteriën aanwezig zijn, dan zal men eerder moeten denken aan een oude besmetting met faeces, dan aan afwezigheid van faecale besmetting.

Uit proeven bleek, dat de citraat positieve colibacteriën tijdens de zelfreiniging van water meer op den voorgrond traden en tenslotte alleen overbleven. Wanneer alle citraat negatieve colibacteriën verdwenen waren, kon altijd een duidelijk verschil worden waargenomen tusschen de gistingsgrenzen bij 46° C. en bij 37° C. In het algemeen trad dit verschil echter al op, voordat de citraat negatieve colibacteriën geheel verdwenen waren.

70 „intermediare” stammen werden uitvoerig onderzocht. 9 hiervan tastten glycerol niet aan en konden dus niet gerekend worden tot het geslacht „Citrobacter”. 14 stammen vormden sporen acetylmethylcarbinol. Butyleenglycol kon daarentegen nooit worden aangetoond. Met behulp van malonaat assimilatie en glycerolvergisting was een indeeling in groepen mogelijk.

Nadat in een aangrenzend vertrek het noenmaal is gebruikt, houdt in de namiddagvergadering *Ir. J. van Beijnum* een voordracht over „Bacteriologie van de groenvoederconserveering”.

Bij de conserveering van groenvoeder, b.v. gras, wordt dit anaeroob bewaard. Er treden dus bacterieele processen op, die

geen lucht behoeven; een dezer processen, en wel een ongewenscht proces, is de boterzuurgisting.

Een onderzoek naar boterzuurbacteriën heeft aan spreker twee types doen kennen:

1e. de gewone suikervergistende boterzuurbacterie (*Cl. saccharobutyricum*)

2e. de lactaatvergistende boterzuurbacterie (*Cl. tyrobutyricum*).

De laatste hoopt zich op in geconserveerd groenvoeder, indien hierin melkzuur aanwezig is door een voorafgaande melkzuurgisting. Voor de kaasbereiding is het van groot belang te weten, welke boterzuurbacterie aanwezig is.

Op een vraag van *Prof. Kluyver*, of er verband bestaat tusschen den aard van het groenvoeder en de fouten bij de kaasbereiding, antwoordt *spreker*, dat hij zelf hierover geen statistieken heeft aangelegd. In Zwitserland is wel het verband aangetoond tusschen het geconserveerd groenvoeder en het aantal boterzuurbacteriën in de faeces der koeien; men heeft daar veel last bij de bereiding der Emmenthalerkaas. In Nederland geschiedt de kaasbereiding op lagere temperatuur en is het verband, al heeft men den indruk, dat dit ook wel degelijk bestaat, niet zoo gemakkelijk aan te toonen. Bovendien vindt in ons land de conserveering van groenvoeder plaats op vele verschillende manieren. Wanneer men geconserveerd voedsel voedert, is het aan te raden dit te doen in het begin van den winter en niet in het voorjaar.

De laatste spreker is *Ir. G. W. Harmsen* met het onderwerp „Gevallen van symbiose bij het aëroob aantasten van cellulose”.

Gevallen van symbiose bij de ontleding van cellulose door microörganismen waren reeds bekend en wel voornamelijk bij de anaërobe vergisting van cellulose, en den laatsten tijd ook bij de aërobe ontleding der cellulose door sommige vertegenwoordigers der Cytophagen — een bijzondere, uitsluitend uit obligate cellulose ontledende organismen bestaande — groep. In al deze gevallen van symbiose heeft men te maken met één organisme, dat als eigenlijke ontleder der cellulose optreedt, door de afscheiding van cellulase, en met een of meer andere microben, die zelf niet in staat zijn cellulose op te lossen maar waarvan de aanwezigheid vereischt is om het eerste organisme in staat

te stellen zich te ontwikkelen en de cellulose aan te tasten.

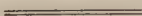
Het afzonderen en zuiver kweken van zulke, van de aanwezigheid van andere organismen afhankelijke, cellulose ontledende microben is dus volgens de gewone werkwijze onuitvoerbaar, zoodat men daarbij tot nog toe genoodzaakt was niet met zuivere cultures maar met mengcultures van beide organismen — dus met symbionten — te werken. Nu is echter gebleken, dat men in deze gevallen vaak toch tot zuivere cultures kan geraken door op den gewonen, cellulose bevattenden voedingsbodem eerst het vereischte — zelfde cellulose niet aantastende — begeleidende organisme te kweken om het daarmee overgroeide substraat daarna te steriliseeren. Op den op deze wijze voorbereiden voedingsbodem kan men dan met de algemeen gebruikelijke techniek ook de van de begeleidende organismen afhankelijke cellulose ontledende microben afzonderen en volkomen zuiver kweken. In enkele gevallen was het zelfs reeds voldoende om aan den overigens vrij synthetischen cellulose bevattenden voedingsbodem een weinig plantaardige of dierlijke extracten toe te voegen om de eerst schijnbaar op symbiose aangewezen organismen in staat te stellen ook volkomen zelfstandig cellulose af te breken. Vermoedelijk berusten al de gevallen van symbiose dus steeds op een behoefte der betrokken organismen aan bepaalde vitamines voor hun leven.

Ook na deze voordracht vindt eenige gedachtenwisseling plaats.

Hiermede aan het eind van het programma gekomen zijnde, sluit de *voorzitter* de vergadering, na *Dr. De Wolff* te hebben bedankt voor de moeite, die zij bij de voorbereiding voor de ontvangst der bijeenkomst heeft gehad.

De secretaris,
H. J. van Nederveen.

's-Gravenhage, Mei 1935.



De bepaling van lipoïde in bloed

DOOR

Prof. Dr. N. SCHOORL.

Voor de bepaling van vet (lipoïde) in bloed wordt in de literatuur meestal de methode van *Kumagawa—Suto* (1908) genoemd, die vrij omslachtig is in de uitvoering, en waarbij na verzeeping der esters en praecipitatie door zoutzuur een aetherisch extract gemaakt wordt, dat daarna door oplossen in petroleumaether wordt gezuiverd en dat bestaat uit hoogere vetzuren en onverzeepbare stof (n.l. cholesterine). Verder wordt door *Gorter* en *de Graaff* aanbevolen de methode van *Schmidt—Bondzynski*, zooals die voor vetbepaling in melk wordt toegepast. Het bleek echter dat deze laatste op runderbloed niet uitvoerbaar is, ten gevolge van heftige emulsiëvorming met den aether, ook wanneer met zoutzuur van 38% gedurende 10 minuten werd gekookt en slechts zacht met aether werd geschud.

Dit was aanleiding om naar een eenvoudige methode voor de bepaling van lipoïde (vet) in ossenbloed te zoeken, waarbij werd uitgegaan van de waarneming van *Bogdanow* (1897), die uit gedroogd vleesch met aether direct slechts onvolledig het vet kon extraheeren, terwijl hem dit wel quantitatief gelukte door eerst van het vleesch een alcoholisch extract te maken en daarna dit extract met aether uit te trekken, waarbij dan gemakkelijk quantitatief het vet in den aether overgaat. Het met alcohol uitgetrokken vleesch stond daarna niet meer vet aan aether af.

De samenstelling van runderbloed is volgens *Hammersten* de volgende: water 81%, vaste stof 19%, waarvan gedetailleerd wordt opgegeven:

eiwitten	17,5 %		
suiker	0,1 %		
lipoïde	0,485 %	{	cholesterine 0,19
			lecithine 0,235
			vet 0,06
zouten	0,84 %		
ureum	0,03 %		
totaal	18,955 %		

Deze bestanddeelen, behalve lipoïde, zijn alle oplosbaar in water, terwijl suiker en ureum ook voldoende in alcohol oplosbaar zijn, maar weinig in aether (ureum 0,01%) en niet in petroleumaether.

Van de stoffen, die onder den verzamelnaam lipoïde worden saamgevat, gelden de volgende oplosbaarheden:

	in Pae	in Ae	in A
vetzuren	+	++	+
neutraal vet (triglyceride)	+	+	—
phosphatiden (lecithine)	—	+	+
cholesterine	+	+	+
cholesterine-esters (oleaat)	—	+	+

Door extractie met aether zou men dus het lipoïde moeten kunnen uittrekken en dit extract eventueel door uittrekken met petroleumaether kunnen scheiden. Echter is te verwachten dat rechtstreeksche extractie van ingedroogd bloed met aether, wegens de groote overmaat eiwitstof, niet tot het doel zal leiden, maar dat beter zal zijn eerst met alcohol te extraheeren, waarin blijkbaar het spoor neutraal vet meegaat (zie boven), en daarna dit alcoholisch extract weder met aether te extraheeren.

1. Als eerste proef werd 10 cm³ runderbloed ¹⁾ opgezogen in een opgerolde strook filtreerpapier (bestemd voor vetbepaling in melk volgens Adams) van Schleicher en Schüll en gedroogd bij 100°. Geëxtraheerd werd met aether in een apparaat van Beadle en Stevens (1913) (verbeterde Soxhlet) ge-

¹⁾ Dit bloed was geconserveerd door bijvoeging van 1 cm³ eener 10% kaliumoxalaatoplossing op 100 cm³ bloed en bevatte dus extra 0.1% oxalaat, dat ook in de droogrest aanwezig zal zijn, maar als zoodanig niet oplost in A en Ae.

durende 6 uur, waarbij elke 10 minuten de aether overhevelde, d.i. een tijd welke in het algemeen voor vetextractie voldoende geacht wordt.

Gewicht van dit *aether-extract* van 10 cm³ bloed004.

De opbrengst aan vet is dus veel te klein en dit zou zeker bij extractie met Pae nog in meerdere mate het geval zijn.

2. Als tweede proef werd 10 cm³ runderbloed op gelijke wijze als bij 1 gedroogd, in een Beadle-apparaat uitgetrokken met absoluten alcohol, eerst (A) gedurende 3 uur met een overhevel-tempo van 10 minuten en daarna (B) nog eens gedurende 3 uur. Het extract, dat na verdamping van den alcohol op het waterbad achterbleef, is gedroogd bij 100° en gewogen. Het is daarna in de extractiekolf bij kamertemperatuur met aether uitgetrokken, achtereenvolgens met 10 cm³, 5 cm³ en 5 cm³, door telkens te schudden, ¼ uur te laten staan en af te schenken. Het extract van den aether is bij 100° gedroogd en gewogen, daarna op gelijke wijze met petroleumaether (kp. 40°—60°) uitgetrokken en dit extract weder bij 100° gedroogd en gewogen. Ook zijn de restanten die niet oplosbaar waren in Ae resp. Pae telkens gedroogd en ter contrôle gewogen, waarbij opgemerkt werd dat het door Ae van vet bevrijde alcoholisch extract, na droging nog al hygroscopisch is en gemakkelijk bij staan aan de lucht in gewicht toeneemt.

Van 10 cm ³ bloed extract uit	alcohol	aether	petrol. aether
A	.022	.013	.010
B	.011	.009	.008
Totaal	.033	.022	.018

Aangezien deze hoeveelheid vet nog lang niet de totale hoeveelheid vet in het bloed van ongeveer 0,5% vertegenwoordigt, is blijkbaar ook de extractie van bij 100° gedroogd bloed met absoluten alcohol na 6 uur nog zoo onvolledig, dat niet te verwachten is dat op deze wijze practisch een quantitative opbrengst in beperkten tijd is te krijgen.

3. Als derde proef is nog 10 cm³ runderbloed opgezogen als bij 1 en 2, maar nu gedroogd bij kamertemperatuur in den vacuum-exsiccator naast zwavelzuur tot constant gewicht. Extractie met absoluten alcohol als boven, maar A 3 uur, B

2 uur, C 3 uur. Het alcoholisch extract is met Ae uitgetrokken, maar dit niet weer telkens met Pae, doch slechts de totale opbrengst.

Van 10 cm ³ bloed extract uit	alcohol	aether	petrol. aether
A	.063	.033	
B	.020	.004	
C	.016	.005	
Totaal	.099	.042	.038

Hoewel de opbrengst hier beter is dan bij 2, is toch blijkbaar geen quantitative uitkomst in beperkten tijd bereikbaar, want de extractie is zelfs na 8 uur nog niet afgelopen.

Er is daarna een anderen weg ingeslagen, naar aanleiding van een onderzoek van *Bönniger* (1901), die voor klinische bedoelingen het alcoholisch extract van bloed bepaalt (d.i. van menschenbloed gemiddeld 0,8%) en dit extract, in navolging van *Hoppe—Seyler* dan als vet beschouwd. Hij brengt daartoe bloed in het 20-voudig volumen alcohol van 96 vol. % (liefst van 30°—40°), laat meerdere dagen staan en bepaalt daarna van het spiritueus filtraat door verdamping het extractgehalte.

In verband met de bovengenoemde waarneming van *Bogdanow* zou waarschijnlijk dit alcoholisch extract gemakkelijk met aether zijn te extraheeren om daaraan de lipoïden te onttrekken, terwijl dit mogelijk ook met petroleumaether zou kunnen geschieden. In ieder geval zou dan het aetherisch extract nog met petroleumaether gezuiverd kunnen worden.

4. Een eerste proef in deze richting werd genomen door 5 cm³ runderbloed, gemeten in een maatglasje, druppelsgewijs te voegen bij 100 cm³ Spiritus fortior (96 vol. %), welke in een Erlenmeyerkolf van 200 cm³ in steeds draaiende beweging werd gehouden. Hierdoor ontstaat een fijn korrelig rood neerslag van de bloedeiwitten. Daarna werd krachtig geschud, het mengsel 3 uur ter bezinking weggezet en de bovenstaande vloeistof daarna door een wattenpropje voorzichtig afgeschonken en daarna zooveel mogelijk vloeistof uit de kolf op dit filter gebracht, waarbij het roode neerslag geheel door het wattenpropje wordt tegengehouden. Het heldere en lichtgele filtraat werd opgevangen in het maatglas, waarmede de alcohol was gemeten

en het volumen daarvan bepaald. Dit bedroeg hier 87 cm^3 , terwijl de totale hoeveelheid aanwezige vloeistof 104 cm^3 zou bedragen, waarbij het watergehalte van het bloed op 80% wordt gesteld en de geringe contractie (n.l. $0,7 \text{ cm}^3$) bij de menging van 100 cm^3 spiritus fortior met 4 cm^3 water wordt verwaarloosd. In een korthalzige ronde kolf van 150 of 200 of 250 cm^3 werd deze 87 cm^3 spiriteuze oplossing verdampt op het waterbad, de rest gedroogd bij 100° en na bekoeling gewogen, waarna het extract vermenigvuldigd met $\frac{104}{87}$ en met 2, het alcoholisch extract van 10 cm^3 bloed oplevert.

Dit extract werd in de kolf 3 maal met aether (10, 5 en 5 cm^3) uitgetrokken als boven onder 2, waarna geconstateerd werd dat verdere uittrekking van de rest met aether, het aetherisch extract niet vermeerdert.

Ten slotte werd het aetherisch extract op dezelfde wijze met petroleumaether (kp. 40° — 60°) uitgetrokken. Ook deze extracten werden met dezelfde omrekening herleid op 10 cm^3 bloed.

Extract uit	alcohol	aether	petrol. aether
gewogen (87 cm^3)	.055	.024	.023
herleid op 10 cm^3 bloed	.121	.058	.055

Het is duidelijk dat deze wijze van extraheeren een aetherextract oplevert dat hooger is dan door extractie van droog bloed (1—3) en dat het lipoïde minstens van even groote zuiverheid is, daar het bijna volledig overgaat in petroleumaether.

Ten einde na te gaan of het mogelijk is nog meer lipoïde met alcohol en aether uit te trekken zijn de beide volgende bepalingen gedaan door in plaats van Spiritus fortior (96 vol. %) absoluten alcohol (99 vol. %) te gebruiken en wel in 100 cm^3 daarvan 10 cm^3 runderbloed (5) resp. 5 cm^3 runderbloed (6) druppelsgewijs uit te storten en verder te handelen als boven. Voor proef 5 worden de gewogen extracten herleid tot die van 10 cm^3 bloed door te vermenigvuldigen met $\frac{108}{78}$ en voor proef 6 met $2 \times \frac{104}{87}$.

Bovendien zijn hier de neerslagen van bloedeiwit uitgewasschen met Spir. fortior (5 keer 30 cm^3), gedroogd bij 100° en daarna 3 maal met aether (15 cm^3 , 10 cm^3 , 5 cm^3) uitge-

trokken om na te gaan of nog vet uit dit zeer fijn korrelig neerslag was te extraheeren.

	alcohol	aether	Pae	Uit neerslag met Ae
5. gewogen (78 cm ³)	.084	.038	.035	.0004
herleid op 10 cm ³ bloed	.116	.053	.049	
6. gewogen (87 cm ³)	.043	.022	.021	.0002
herleid op 10 cm ³ bloed	.103	.053	.050	

Hieruit volgt: 1e. dat door alcoholconcentratie nog hooger op te voeren dan in proef 4 niet meer vet in het alcoholisch extract is te krijgen, 2e. dat in het op deze wijze verkregen neerslag geen vet meer aantoonbaar is. Het gehalte aan lipoïde van dit runderbloed is dus 0,53% (in Ae) of 0,50% (in Pae) en dat in proef 4 nog iets hoogere uitkomst werd verkregen is vermoedelijk een fout bij het afmeten van het bloed in een maatglaasje.

Ten einde na te gaan of bij deze vetbepaling nog alcohol gespaard kan worden is de volgende reeks bepalingen (7, 8 en 9) gedaan met op 10 cm³ runderbloed de afdalende hoeveelheden van 100, 50 en 25 cm³ Spir. fortior. Reeds na 1 uur is hier de vloeistof door een wattenpropje afgeschonken en werd opgevangen 81 cm³, 35 cm³ en 16 cm³, zoodat de omrekenfactoren worden $\frac{108}{81}$, $\frac{54}{35}$ en $\frac{32}{16}$. Van het alcoholisch extract is hier alleen het in aether oplosbaar gedeelte bepaald.

	Extract uit alcohol	aether	petrol aether
7. gewogen (81 cm ³)	.085 ⁵	.028 ⁵	.028
herleid tot 10 cm ³ bloed	.115	.038	.038
8. gewogen (35 cm ³)	.066	.018	
herleid tot 10 cm ³ bloed	.109	.030	
9. gewogen (16 cm ³)	.056	.011	
herleid tot 10 cm ³ bloed	.116	.023	

Wanneer de alcoholconcentratie lager wordt, verandert dus wel is waar het alcoholisch extract weinig, maar de hoeveelheid vet daarin neemt gaandeweg af. Blijkbaar komt dan niet al het lipoïde meer in oplossing, maar komt het gedeeltelijk ook in het neerslag en wel des te meer naarmate de alcoholconcentratie lager wordt. Zelfs bepaling 7 geeft reeds een te lage uitkomst aan vet, zoodat men bij gebruik van 10 cm³ runderbloed

noodzakelijk 100 cm³ absoluten alcohol moet gebruiken (zie proef 5) en niet volstaan kan met 100 cm³ Spiritus fortior.

Tenslotte is nog de mogelijkheid nagegaan om het alcoholisch extract onmiddellijk met petroleumaether (kp. 40°—60°) uit te trekken door een bepaling conform 7. Gevonden werd:

	Extract uit	alcohol	petr. aether
10.	gewogen (75 cm ³)	.075	.028
	herleid tot 10 cm ³ bloed	.108	.040

Hieruit blijkt dat het even goed mogelijk is om direct uit het alcoholisch extract het vet in Pae op te lossen (vergelijk 10 met 7). Men dient dan echter — meer nog dan bij het gebruik van aether — ter dege op te letten dat het alcoholisch extract volmaakt droog is.

Voor de practijk zal men het aetherisch extract in den regel als voldoende zuiver lipoïde kunnen beschouwen. Alleen wanneer men dit op zuiverheid wil toetsen of een gedeeltelijke scheiding der lipoïdestoffen wil bereiken, zal men het aetherisch extract nog met petroleumaether gaan uittrekken of direct petroleumaether gebruiken.

Uit het bovenstaande volgt als *voorschrift* voor snelle en eenvoudige quantitatieve bepaling van lipoïde in runderbloed:

Het monster bloed wordt door omzwenken homogeen gemaakt en 5 cm³ liefst met een pipet (desnoods met een nauwkeurig maatglasje) genomen en deze in hetzij 100 cm³ Spir. fortior, hetzij 50 cm³ absoluten alcohol gedruppeld, waarbij de vloeistof in een Erlenmeyerkolf in voortdurende beweging wordt gehouden. De kolf wordt krachtig geschud en met een kurk gesloten gedurende 1—3 uur ter bezinking weggezet. Daarna wordt de bovenstaande vloeistof voorzichtig door een wattenpropje geschonken, aangebracht in een trechter, die op hetzelfde maatglas geplaatst wordt, waarin de alcohol werd gemeten. Men zorgt zooveel mogelijk filtraat te krijgen, waarvan het volumen wordt genoteerd. Dit wordt overgeschonken in een korthalzige rondkolf (extractiekolf) van passende grootte en op het waterbad verdampt, waarbij op het einde de kolf in schuinen stand op het waterbad wordt gedraaid om het extract over een groot oppervlak te verdeelen. Terwijl de kolf nog

warm is wordt de laatste alcohol damp met de waterstraalpomp uit de kolf weggezogen. Na bekoeling wordt dit extract met peroxyde-vrije aether of laagkokenden petroleumaether (Kp. 40° — 60°) 10 cm^3 , 5 cm^3 en 5 cm^3 uitgespoeld, waarbij de eerste maal ten minste $\frac{1}{4}$ uur wordt gewacht en eenige malen omgezwenkt; de beide laatste malen is het voldoende een maal om te zwenken en 5 minuten te wachten. De aetherische oplossing wordt in een getarreerd kleiner extractiekolfje (100 cm^3) overgeschonken, de aether resp. petroleumaether wordt bij zeer zachte warmte verdampt en het kolfje met vet gedroogd op het waterbad (aetherdamp eenige malen wegzuigen) of $\frac{1}{2}$ uur in de droogstof bij 100° . Na volledige afkoeling (geen exsiccator gebruiken!) wordt gewogen en omgerekend op 10 cm^3 bloed met den factor:

$\frac{2 \times 104}{\text{cm}^3 \text{ filtraat}}$, bij gebruik van 100 cm^3 Spir. fortior

$\frac{2 \times 54}{\text{cm}^3 \text{ filtraat}}$, bij gebruik van 50 cm^3 abs. alcohol.

Men kan natuurlijk ook wel voor de analyse van 10 cm^3 bloed uitgaan, maar moet dan 200 cm^3 Spir. fortior of 100 cm^3 absoluten alcohol voor de praecipitatie nemen.

Opmerkingen.

Behalve op het alcoholgehalte van den Spiritus fortior en den absoluten alcohol, moet vooral gelet worden op de kwaliteit van den aether, die liefst moet voldoen aan alle eischen der Pharmacopee, maar in ieder geval bij schudden van 5 cm^3 met 1 cm^3 water waarin $\pm 50\text{ mg}$ KJ is opgelost, geen geelkleuring mag geven.

De nauwkeurigheid der bepaling van de kleine hoeveelheden vet (enkele tientallen mg) hangt, behalve van de gevoeligheid der balans, vooral af van het nauwkeurig wegen van de extractiekolf zonder en met inhoud, n.l. na volkomen bekoeling, waarbij het volstrekt onvoldoende is de temperatuur met de hand te beoordeelen. Het kolfje met vet moet evenwel *spoedig* na de volledige bekoeling gewogen worden, want dit runderbloedvet bleek bij een nacht open staan aan de lucht groote hoeveelheden *water aan te trekken* (relatief 10—20%), welke door even te drogen op het waterbad of in de stoof bij 100° weer zijn te verwijderen.

De bepaling is zoo eenvoudig, dat gemakkelijk door een persoon 24 monsters op een werkdag zijn te onderzoeken.

Het feit, dat hier het vet zoo geschikt quantitatief met alcohol kan uitgetrokken worden, staat wel in verband met de samenstelling van het bloedvet, waar triglyceride zeer in de minderheid is.

Het is achteraf gebleken dat nog sporen lipoïde bij de praecipitatie met alcohol niet overgaan in de alcoholische oplossing maar achterblijven in het eiwitcoagulum. Door dit van de proeven 5 en 6 in vacuo te drogen en daarna in het Beadle-apparaat met aether uit te trekken gedurende 6 uur werd nog 10 mg vet en door deze extractie 4×6 uur voort te zetten nog 6 mg vet verzameld, zoodat in het geheel 16 mg vet in het eiwitcoagulum is gevonden, vertegenwoordigende een tekort op het vet in de alcoholische oplossing, zijnde $2 \times 53 = 106$ mg.

Blijkens de proeven 4 en 5 is het niet mogelijk om verder te komen door de alcoholconcentratie te verhoogen en is de kleine fractie van vet, n.l. 16 van de 122 mg, welke door het eiwitneerslag wordt ingesloten, vrij constant.

Hoewel bovenstaande methode derhalve nog geen absoluut quantitatieve bepaling van het lipoïde in bloed geeft, behoudt zij door hare eenvoudigheid van uitvoering, haar waarde, vooral voor vergelijkend onderzoek.

LITERATUUR.

Kumagawa—Suto, Biochem. Ztschr. 8, 212—347 (1908).

Elly Bogdanow, Pfüger's Arch. 68, 431—33 (1897).

Bönniger, Z. klin. Med. 42, 65—71 (1901).

Hammersten, Lehrbuch d. physiolog. Chem. 1907, bl. 238,

Utrecht, April 1935.

De vorming van waterstof uit glucose en mierenzuur door z.g. „rustende” colibacteriën. I.

DOOR

Dr. A. TASMAN en Dr. A. W. POT.

Gedurende de laatste jaren hebben *Marjory Stephenson* en *Leonard H. Stickland* 1) een reeks onderzoekingen gepubliceerd, betrekking hebbende op de ontleding van glucose en mierenzuur door z.g. „rustende” colibacteriën. Zij concentreerden hun aandacht in hoofdzaak op de zich hierbij al dan niet ontwikkelende waterstof en meenden in hun bacteriepreparaten (op caseïne-pepton gekweekte, gecentrifugeerde, gewassen en in bufferoplossingen gesuspenderde colibacillen) in dit verband drie verschillende enzymen te moeten aannemen n.l.:

1. *Dehydrogenase*, een enzym, dat de waterstofatomen in het substraatmolecuul activeert, indien er tevens een geschikte waterstofacceptor aanwezig is. Voorbeeld: mierenzuurdehydrogenase katalyseert de reactie $\text{HCOOH} + \text{R} \rightleftharpoons \text{RH}_2 + \text{CO}_2$. Als waterstofacceptor kan hier o.a. methyleenblauw dienst doen.

2. *Hydrogenase*, een ferment, dat onder dezelfde omstandigheden, in het substraat aanwezige moleculaire waterstof activeert en op een geschikte acceptor overdraagt. Deze reactie kan voorgesteld worden door de vergelijkingen: $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}$ en $2 \text{H} + \text{R} \rightleftharpoons \text{RH}_2$. Als acceptor kan hier weer methyleenblauw of zelfs moleculaire zuurstof dienst doen.

3. *Hydrogeenlyase*, dat uit mierenzuur of glucose moleculaire waterstof vrij maakt (zonder aanwezigheid van een acceptor). Deze reactie wordt voor de mierenzuurontleding dus voorgesteld door $\text{HCOOH} \rightleftharpoons \text{H}_2 + \text{CO}_2$.

Geheel consequent in hun benamingen zijn de auteurs even-

wel niet. Op de eene plaats (Biochem. J. 25, 213 (1931)) wordt de ontleding van mierenzuur in moleculaire waterstof en koolzuur toegeschreven aan de gecombineerde werking van de enzymen „formic- dehydrogenase” en „hydrogenase”, terwijl later (ibid 26, 715 (1932)) dezelfde werking aan „formic-hydrogenlyase” geweten wordt. Doch dit is misschien slechts te wijten aan een zich tijdens het experimenteren vormende en wijzigende gedachtengang en verder ook niet van overwegend belang.

Het cardinale punt in de publicaties van genoemde schrijvers is voor ons echter het feit, dat zij een principieel onderscheid maken tusschen de vorming van moleculaire waterstof uit *glucose* en die uit *mierenzuur*, waarvoor zij verantwoordelijk stellen resp. de enzymen „glucose-hydrogenlyase” en „formic-hydrogenlyase”. De vorming van waterstof uit glucose zou dus *niet* via het bij de vergisting door colibacillen steeds optredende mierenzuur verlopen, doch een hiervan principieel onafhankelijk proces voorstellen.

Karström 2) maakte in navolging van *Dienert* 3) onderscheid tusschen *constitutieve* en *adaptieve* enzymen. De eersten zouden te allen tijde in de bacteriecel aanwezig zijn, onafhankelijk van de wijze van kweken, de adaptieve enzymen slechts gevormd worden door een speciale prikkel tijdens den groei in het een of andere medium uitgeoefend door de stof, die in latere experimenten (met „rustende” microben) gesplitst moet worden.

Yudkin 4) heeft deze voorstellingswijze nog eenigszins uitgebreid door te spreken van *constitutieve* enzymen en dezulke, welke door zuivere „*adaptation*” of door „*training*” verkregen zijn. Het verschil tusschen de laatste twee categoriën zou zijn, dat een door „training” (d.w.z. meer of minder langdurig voortkweken in een passenden voedingsbodem) verkregen enzymen zich bij latere overenting in een medium, dat de desbetreffende prikkelende substantie mist, bij opeenvolgende generaties niet of slechts zeer langzaam verloren zou gaan, terwijl een adaptief enzym zeer spoedig verdwijnen zou, zoodra voortgekweekt wordt in een medium zonder speciale enzymregulator. Volgens deze opvattingen zou „glucose-hydrogenlyase” een *constitutief*- en „formic-hydrogenlyase” een *adaptief* enzym zijn.

Deze principieele onderscheiding tusschen de enzymen, die

waterstof uit glucose of uit mierenzuur vrijmaken zou volgens *Stephenson* en *Stickland* gewettigd zijn op grond van de volgende feiten:

1. Wanneer colibacteriën onder bepaalde omstandigheden (meer of minder sterk anaëroob) gekweekt worden op caseïne-pepton *zonder glucose* of *formiaat*, daarna gecentrifugeerd, gewasschen en in een passende fosphaatbuffer gesuspendeerd, vormt deze suspensie uit *glucose wèl* gas (waterstof bevattende), maar tast *formiaat niet* aan. Slechts wanneer van tevoren formiaat of glucose (waaruit zich bij ontleding o.a. mierenzuur vormt) aanwezig is, verkrijgt de aldus bereide bacteriesuspensie de eigenschap om naast glucose ook formiaat onder gasvorming te ontleden.

2. De P_H -optima van de beide enzymen zouden verschillend zijn, n.l. voor glucose-hydrogenlyase 6,2, terwijl de gunstigste P_H voor de vorming van waterstof uit mierenzuur 7,0 zou zijn.

3. De affiniteit van de beide enzymen t.o.v. de passende substraten zou ongelijk zijn, n.l. voor glucose-hydrogenlyase véél groter dan voor het mierenzuur splitsende enzym.

4. De vorming van waterstof uit glucose zou momentaan, zonder eenige „lag”-periode en lineair geschieden hetgeen volgens *Stephenson* en *Stickland* niet te verwachten zou zijn, indien de waterstofvorming uit glucose via mierenzuur plaats vond.

Zij formuleeren in deze hun eindconclusie dan ook aldus: „The present state of our knowledge on this point is therefore that the hydrogen from glucose does not come through formic acid and that it is liberated by an enzyme which is not formic-hydrogenlyase; whether it is liberated direct from the glucose-molecule or from some other intermediate compound we do not know, though the absolute linearity of the reaction indicates that the former may be true”.

Een samenvatting van deze onderzoeken, tevens omvattende de hierboven aangehaalde conclusie werd door *Marjory Stephenson* gegeven in de *Annual Review of Biochemistry* 5).

Daar deze opvatting van de ontleding van glucose, resp. de wijze, waarop hierbij waterstof gevormd wordt, niet alleen in strijd is met de hierop betrekking hebbende, tot nu toe alge-

meen aanvaarde voorstellingswijze, doch bovendien niet te vereenigen is met de resultaten van onze eigen proeven betreffende de glucose-vergisting door gaslooze en gasvormende paratyphusbacillen, leek het ons loonend van dit vraagstuk een nadere studie te maken.

Allereerst hebben wij nagegaan, in hoeverre het inderdaad mogelijk is om suspensies van colibacteriën te bereiden, waardoor uit glucose *wél* en uit mierenzuur *géén* waterstof gevormd wordt. Voor de bereiding van deze suspensies werd dezelfde techniek toegepast als door *Stephenson* en *Stickland* beschreven is.

In den beginne gebruikten wij als stikstofbron voor onze voedingsbodem pepton-Witte, later werd ook caseïne-pepton toegepast. De bereiding van dit laatste product geschiedde volgens een voorschrift, afkomstig van *Stickland* (persoonlijke mededeeling). Dit voorschrift komt practisch overeen met dat van *Cole* en *Onslow* 6). Het komt neer op een vertering van als natriumzout opgeloste caseïne door middel van een krachtig werkend trypsinepreparaat. Tenzij anders vermeld is, werd voor de bereiding van caseïne-pepton steeds uitgegaan van de goedkoopste caseinum technicum.

Onze eerste colistam (261) werd geïsoleerd door een druppel faeces-suspensie op peptonagarplaten (1% pepton-Witte, ½% keukenzout, 2% agar in leidingwater) uit te strijken en enkele afgeënte koloniën op hun eigenschappen te onderzoeken. De tweede stam (1452) werd op overeenkomstige wijze op caseïne-pepton agar geïsoleerd. De colistam „*Stickland*” ontvingen wij van *Stickland*, waarvoor wij hem hier nogmaals onzen hartelijken dank betuigen. Deze stam was oorspronkelijk afkomstig uit de National Collection of Type-cultures te Londen en dus vermoedelijk reeds vele jaren op kunstmatige voedingsbodems voortgekweekt. De laatste twee stammen (3812 en 3813) werden weer evenals de eerste op pepton-Witte-agar geïsoleerd. Alle stammen werden op de gebruikelijke wijze op hun eigenschappen gecontrôleerd.

Daar *Stephenson* en *Stickland* mededeelden, dat zij hun coli-culturen laten groeien in vloeibare caseïne-pepton in Roux-flesschen, dus vrijwel volledig aeroob, *Yudkin* daarentegen constateerde dat onder strikt aerobe omstandigheden „glucose-hydrogenlyase” slechts zeer weinig, „formic-hydrogenlyase” in

No.	Datum	M E D I U M	Stam 261			
			glucose		formiaat	
			1	2	1	2
1	7. 2. '34	1 % pepton-Witte-agar	+	+	—	—
2	10. 2. '34	1 % pepton-Witte, 1 % glucose-agar	+	+	—	—
3	10. 2. '34	1 % pepton-Witte, 1 % calciumformiaat-agar	+	+	—	—
4	21. 2. '34	Idem 1)	+	+	+	+
5	3. 6. '34	Caseïne-pepton vloeibaar				
6	6. 6. '34	Idem	++	++	+++	+
7	8. 6. '34	1 % pepton-Witte vloeibaar	+	+	—	—
8	10. 6. '34	3 % pepton-Witte vloeibaar	+	+	++	+
9	18. 6. '34	Caseïne-pepton-agar	++	++	+++	+
10	28. 6. '34	3 % pepton-Witte-agar 2)	—	—	++	+
11	7. 7. '34	1 % pepton-Witte-agar	—	sp.	+	+
12	17. 7. '34	Caseïne-pepton (puriss. Grubler)-agar 3)	—	—	++	+
13	18. 7. '34	Caseïne-pepton (puriss. Grubler) vloeibaar	+	+	+	+
14	21. 7. '34	1 % pepton-Witte vloeibaar	+	+	—	—
15	21. 7. '34	Caseïne-pepton vloeibaar	++	++	++++	+
16	21. 7. '34	Caseïne-pepton-agar	++	++	+++	+
17	4. 4. '35	Pepton-Witte-agar				
18	12. 4. '35	Idem 4)				
19	25. 4. '35	Caseïne-pepton-agar 5)				

- 1) Stam van te voren 9-maal over calciumformiaat gepasseerd.
- 2) Stammen 261 en 1452 reeds eenige malen op caseïne-pepton overgeënt.
- 3) 8 voorafgaande overzettingen op caseïne-pepton purissimum.
- 4) Na \pm 4 uur was uit glucose méér gas gevormd dan uit formiaat, na 24 uur uit beide
- 5) Stam 3812 9-maal en stam 3813 van te voren 4-maal op caseïne-pepton overgeënt.

52		Stam „Stickland“				Stam 3812				Stam 3818			
formiaat		glucose		formiaat		glucose		formiaat		glucose		formiaat	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
++	+++												
sp.	sp.												
++	++												
++	+++	++	++	+++	+++								
++	++	sp.	sp.	—	—								
++	+++	+	—	+++	+++								
++	+++	—	sp.	++	++								
++	+++	+	+	+	+								
—	—	+	+	sp.	sp.								
+++	++++	+	+	++++	++++								
++	++	++	++	+++	+++								
						+++	+++	++	++				
						++	++	++++	++++	+	+	++++	++++

't geheel niet gevormd wordt, leek het ons niet onwaarschijnlijk, dat de productie van de beide enzymen meer of minder sterk afhankelijk zou zijn van de al dan niet aerobe toestand gedurende den groei.

Onze proeven werden nu op de volgende wijze uitgevoerd:

1. *Wijze van kweken.*

- a. aëroob op pepton-Witte-agar.
- b. aëroob op pepton-Witte-agar, waaraan 1% glucose toegevoegd was.
- c. aëroob op pepton-Witte-agar, waaraan 1% calciumformiaat toegevoegd was.
- d. grootendeels anaëroob in vloeibare pepton-Witte (1% pepton, $\frac{1}{2}$ % keukenzout in leidingwater).
- e. evenals bij d. in een 3% pepton-Witte-oplossing.
- f. evenals bij d. in vloeibare caseïne-pepton.
- g. aëroob op caseïne-pepton-agar.
- h. aëroob op caseïne-pepton-agar, waarbij uitgegaan was van de zeer zuivere caseïne-puriss. Grüber.
- j. als bij d. in vloeibare caseïne-pepton-puriss. Grüber.

2. *Bereiding der suspensies.*

Na 20—24 uur bebroeding werden de vloeibare culturen direct, de vaste kweken na afschudden met physiologische zoutsolutie gecentrifugeerd. De verkregen neerslagen werden tweemaal met zoutsolutie gewasschen en tenslotte in een klein volume zoutsolutie gesuspendeerd. Daar al onze colistammen véél beter groeiden in of op caseïne-pepton dan in of op pepton-Witte, waren de via den eerstgenoemden voedingsbodem verkregen suspensies meestal dikker dan die welke via pepton-Witte bereid waren. Daar de hieronder mede te deelen resultaten slechts een kwalitatief karakter dragen, deden wij geen moeite om alle suspensies op gelijke dichtheid te verdunnen.

3. *Inrichting der gistproeven.*

Stephenson, *Stickland* en *Yudkin* gebruikten bij hun proeven, die van quantitatieven aard waren, de nauwkeurige manometrische methode (zie voor bijzonderheden hierover *Dixon* 7). Daar ons de desbetreffende apparatuur niet ter beschikking stond, vergenoegden wij ons ermede, de al of niet gasvorming uit glucose en formiaat na te gaan in de bekende Einhorn-vergistingsbuisjes. Daartoe werd 15 ccm van de desbetreffende suspensie gemengd met 15 ccm van een 1% natriumformiaat-

oplossing in een fosphaatbuffer van $P_H = 7,0$ en 15 ccm suspensie gevoegd bij 15 ccm 1% glucoseoplossing in fosphaatbuffer $P_H = 6,2$. De formiaat- en glucose-oplossingen waren van te voren gedurende 12 minuten op 115° gesteriliseerd, hetgeen zonder eenig verlies of ontleding van suiker geschied kan. Met de op deze wijze bereide mengsels werden Einhornbuisjes van 10 ccm inhoud gevuld en deze vervolgens in de broedstoof bij 40° geplaatst. Het eindresultaat van de vergisting, d.w.z. de al dan niet gasvorming werd definitief na 24 uur afgelezen. Geconstateerd werd, dat wanneer gas gevormd was, dit steeds uit een mengsel van waterstof en koolzuur bestond. Uit hoofde van het zuiver kwalitatieve karakter van deze proeven, werd niet getracht de ontwikkelde hoeveelheden gas quantitatief te bepalen doch slechts een ruwe schatting van deze hoeveelheden aangegeven op de volgende wijze:

— = geen gasvorming.

sp. = spoor gasvorming.

† = duidelijke gasvorming.

++ tot ++++ krachtige tot overvloedige gasvorming.

De bij onze in duplo uitgevoerde bepalingen verkregen resultaten zijn in bijgaande tabel vereenigd.

Hierbij valt nu het volgende op te merken:

1. Alle suspensies van alle stammen, verkregen door kweken in of op caseïne-pepton vergistten formiaat onder gasvorming.

2. Op één uitzondering na (nr. 12) werd door de onder 1 genoemde suspensies tevens uit glucose gas gevormd. Bij proef 13, stam 261 was deze laatste hoeveelheid gas gelijk aan die, welke uit formiaat ontstond; bij alle andere proeven werd uit formiaat meer en sneller gas gevormd dan uit glucose. Daar de meermalen genoemde Engelsche onderzoekers als basis voor hun media steeds caseïne-pepton gebruikten, zijn hun resultaten dus in markante tegenspraak met de onze. Daar wij onze caseïne-pepton nauwkeurig volgens *Stickland's* voorschrift bereidden en ook geen principieel verschil constateerden tusschen de caseïne-pepton, bereid met ruwe handelscaseïne en die, waarbij uitgegaan werd van de zeer zuivere caseïne puriss. Grüber, kunnen wij ons deze discrepantie niet verklaren. Ten overvloede zij nog vermeld, dat onze caseïne-pepton steeds vrij

was van reduceerende suikers (ev. lactose of glucose) en formiaat.

3. De suspensies bereid met voedingsbodems, waarbij van pepton-Witte uitgegaan was, gedroegen zich eenigszins afwijkend van het hierboven weergegeven beeld. De eerste drie proeven (1, 2 en 3) met stam 261 gaven den indruk, dat wij hier inderdaad te maken hadden met een stam, welke zou beantwoorden aan het door *Stephenson* en *Stickland* beschreven type. Bij deze proeven werd uit glucose weinig, doch zeer duidelijk gas gevormd, terwijl de gasvorming uit formiaat achterwege bleef. Zoodra deze stam echter op caseïne-pepton geënt werd, werd steeds uit formiaat gas gevormd. Entten wij dezen stam vervolgens weer op pepton-Witte-agar (proeven 10 en 11) dan vertoonde hij niet meer zijn oorspronkelijke eigenschappen. Bij een herhaling van deze proeven, waarbij de versch op pepton-Witte geïsoleerde stammen 3812 en 3813 gebruikt werden, gelukte het ons wel om uit glucose een gelijke of krachtiger gasvorming te verkrijgen dan uit formiaat, doch deze laatste ontbrak niet (proeven 17 en 18). Werden dezelfde stammen vervolgens weer op caseïne-pepton-agar geënt, (proef 19) dan was de gasvorming uit formiaat weer veel sterker dan uit glucose.

Werd op vloeibare pepton-Witte (1%) gekweekt (proeven 7 en 14) dan werd uit glucose wel, uit mierenzuur géén of slechts een spoor gas gevormd. Een duidelijk verschil hiermede vertoonde echter proef 10, waarbij een 3% pepton-Witte-oplossing gebruikt werd. De met deze suspensies uitgevoerde vergistingen sluiten zich geheel aan bij die, waarbij caseïne-pepton als voedingsbodem diende.

Overzien we het geheel van de bovenbeschreven proeven, dan komen wij dus tot de slotsom, dat wij er niet in slaagden door kweken in of op caseïne-pepton suspensies van colibacteriën te bereiden, welke volgens *Stephenson* en *Stickland* „formic-hydrogenlyase” zouden missen, hoewel bij geen dezer proeven formiaat of glucose in de gebruikte media aanwezig was.

De bij de proeven met pepton-Witte verkregen resultaten, hoewel minder uniform van karakter, wijzen zeker *niet* in de omgekeerde richting.

Stephenson en *Stickland* toonden aan, dat de ontleding van

mierenzuur zéér veel sneller geschiedt, indien de cellen zich krachtig kunnen vermeerderen, hetzij door de aanwezigheid van pepton in het medium, hetzij ten koste van afgestorven en geautolyseerde bacteriën. Men zou dus de veronderstelling kunnen opperen, dat de gasvorming uit formiaat bij onze proeven te wijten zou zijn aan groei van de desbetreffende micro-organismen, doch daar de gasontwikkeling uit formiaat bij alle caseïne-peptonproeven oogenblikkelijk inzette, dikwijls nog voordat de Einhornbuisjes in de stoof geplaatst waren, kan deze mogelijkheid gevoegelijk uitgeschakeld worden.

In 1931 isoleerde één onzer (*Pot 8*) bij het routine-onderzoek in de bacteriologische afdeling van het voormalige Centraal Laboratorium 3 paratyphus-B-stammen, welke zich serologisch en biochemisch als „normale” paratyphusstammen gedroegen, op één uitzondering na, n.l. dat zij het vermogen misten om uit druivensuiker gas te vormen. Wij vonden een eenvoudig middel om dergelijke paratyphusstammen hun vermogen tot gasvorming uit glucose *én* uit mierenzuur terug te geven, n.l. een meer of minder lang voortgezet kweken in een voedingsbodem, welke calciumformiaat bevatte 9). Werd uit calciumformiaat gas gevormd, dan was tegelijkertijd het vermogen om uit druivensuiker gas te vormen teruggekeerd.

Bij dit onderzoek werd verder uitvoerig quantitatief de glucose-vergisting bestudeerd 10). Zonder hier verder op in te gaan, kan volstaan worden met de mededeeling, dat alle in het onderzoek betrokken stammen („gaslooze”- en door calciumformiaatpassage tot gasvorming gebrachte „gasvormende” — paratyphusstammen, benevens contrôle typhus- en paratyphusstammen) de glucose op principieel dezelfde wijze afbreken, met dit onderlinge verschil echter, dat de typhus- en „gaslooze”-paratyphusstammen het bij deze ontleding optredende mierenzuur niet vermogen te splitsen, een prestatie, waartoe de „normale”- en tot gasvorming gebrachte „gaslooze” paratyphusstammen wel in staat zijn. Uit deze proeven bleek ten duidelijkste, dat bij glucose-vergistingen met groeiende, zich vermeerderende bacteriën, de hierbij vrijkomende waterstof geheel of nagenoeg geheel afkomstig is uit het bij die ontleding intermediair optredende mierenzuur (het z.g. „mierenzuurschema”).

Tevens werd aangetoond, dat onder bepaalde omstandigheden een zéér klein gedeelte van de ontstane waterstof haar

oorsprong kan vinden in het bij de vergisting van glucose zeer waarschijnlijk als tusschenproduct optredende methylglyoxaalhydraat, waarbij de laatstgenoemde verbinding zich in pyrodruivenzuur en waterstof splitst (het z.g. „pyrodruivenzuurschema”). Een en ander bleek volkomen in overeenstemming te zijn met de proeven en conclusies van *Scheffer* 11), die uitvoerig de glucose-vergisting door diverse andere vertegenwoordigers der coli-typhus-dysenteriegroep onderzocht.

Zouden er dus *twee* enzymen zijn, welke de waterstofvorming uit glucose bewerkstelligen, dan zouden onze „gaslooze” stammen *beide* enzymen missen. Verkrijgen ze door calciumformiaatpassage het mierenzuurhydrogeenlyase, dan verkrijgen ze *tevens* het glucosehydrogeenlyase. We zouden dan voor den formaatprikkel een gelijktijdige reguleering van de *beide* enzymen moeten aannemen. Dit is bovendien in tegenpraak met de opvattingen van *Karström*, die glucose-hydrogeenlyase een *constitutief* en mierenzuurhydrogeenlyase een *adaptief* enzym noemt.

Een andere mogelijkheid is deze, dat door den mierenzuurprikkel alléén de mierenzuurhydrogeenlyase gereguleerd wordt en dat *nu* het gas uit glucose, *in tegenstelling met hetgeen bij een normale vergisting verondersteld wordt het geval te zijn*, wél uit mierenzuur gevormd wordt. We zouden dus moeten aannemen dat alléén onze tot gasvorming gebrachte paratyphusstammen bij de glucosevergisting de waterstof door ontleding van mierenzuur vormen, dat „normale” paratyphus- en colistammen een *ander* vergistingsschema volgen, ondanks het feit, dat wij vele vergistingsbalansen voor deze suikerontledingen door de diverse stammen konden opstellen, welke geenerlei principiële verschillen onderling te zien gaven; een veronderstelling, welke zeker geen groote waarschijnlijkheid bezit.

Ook *Stephenson*, *Stickland* en *Yudkin* deelen feiten mede, welke niet zonder meer in overeenstemming gebracht kunnen worden met hunne theoretische beschouwingen. De eerste onderzoekers deelen mede, dat een suspensie, gegroeid op caseïne-pepton mét formiaat uit formiaat bij $P_H = 7,0$ met dezelfde snelheid waterstof ontwikkelt als bij $P_H = 6,2$ uit glucose; een op formiaat-vrije caseïne-pepton gekweekte suspensie echter vergist géén formiaat, vormt uit glucose wél waterstof, echter met een snelheid die 10—15% is van dit, welke de eerst-

genoemde suspensie bezit. Zij vonden bovendien, dat de waterstofontwikkeling uit glucose steeds gepaard ging aan de vorming van een ongeveer aequivalente hoeveelheid koolzuur. Dit wijst op de vorming van deze waterstof uit intermediair gevormd mierenzuur, waarbij steeds gelijke hoeveelheden waterstof en koolzuur moeten ontstaan.

Yudkin constateert dat kweken op formiaathoudende voedingsbodems steeds ook het vermogen om uit de glucose gas te vormen versterkt, hoewel niet in die mate als het kweken in tegenwoordigheid van glucose. Hij kan zich van deze regulatie moeilijk een denkbeeld vormen, daar volgens hem de ontleding van formiaat in waterstof en koolzuur geen reactie is, welke de levende bacteriecel energetisch ten goede kan komen. Wij hebben echter aangetoond 12), dat de genoemde splitsing wel degelijk vrije energie ter beschikking van de bacteriecel stelt, hetgeen ook een plausibele verklaring is voor het feit, dat een bepaalde kweek van gasloze paratyphusbacteriën steeds een krachtige vermeerdering van levende organismen vertoont op het moment, dat het vermogen om mierenzuur te splitsen verkregen wordt.

Wij meenen dus als voorloopig resultaat van onze proeven en theoretische beschouwingen te moeten aannemen, dat bij de ontleding van glucose door groeiende en „rustende” colibacteriën de hierbij optredende waterstof in de overwegende meerderheid van de gevallen uit als tusschenproduct optredend mierenzuur afkomstig is. Hiernaast kan in enkele gevallen een zeer kleine hoeveelheid waterstof haar oorsprong vinden in een ontleding van de glucose via het z.g. „pyrodruivenzuurschema”, doch deze laatste vormingswijze van waterstof speelt te allen tijde een ondergeschikte rol.

Het lijkt ons bovendien niet wenschelijk om hiervoor verschillende enzymen aan te nemen. Wij stellen ons hierbij geheel op het standpunt van *Klayver* 13), die ten sterkste waarschuwt tegen het aannemen van telkens weer nieuwe z.g. „specifieke” enzymen voor de verschillende oxydo-reductie-reacties” resp. waterstofactiveringen, welke bij de verschillende ontledingen te voorschijn blijken te komen.

Ten slotte zij nog medegedeeld, dat wij in een volgende publicatie de glucosevergiftiging door rustende colibacteriën van een quantitatief standpunt hopen te berichten, door het opstellen van z.g. vergistingsbalansen.

Samenvatting.

1. Er werd een overzicht gegeven van de onderzoekingen van *Marjory Stephenson*, *L. H. Stickland* en *J. Yudkin*, betrekking hebbende op de vorming van waterstof (en koolzuur) bij de ontleding van glucose en mierenzuur door z.g. „rustende” colibacteriën. Genoemde onderzoekers meenen de vorming van waterstof uit deze twee stoffen als twee verschillende, onderling onafhankelijke processen te moeten opvatten, o.a. op grond van het feit, dat het hun gelukt zou zijn suspensies van colibacillen te bereiden, die glucose wél en formiaat niét onder waterstofvorming ontleden.

2. Bij herhaling van hun proeven, d.w.z. kweken op denzelfden voedingsbodem als zij gebruikten, gelukte het ons niet hun resultaten te bevestigen.

3. Op grond van deze experimenteele resultaten en theoretische beschouwingen komen wij tot de slotsom, dat de vorming van waterstof uit glucose wel degelijk in de overwegende meerderheid van gevallen via het intermediair optredende mierenzuur plaats vindt en slechts onder bepaalde omstandigheden voor een klein gedeelte op andere wijze tot stand komt.

LITERATUUR.

- 1) *L. H. Stickland*, *Biochem. J.* **23**, 1187 (1929).
M. Stephenson en *L. H. Stickland*, *Biochem. J.* **25**, 205 (1931); **26**, 712 (1932); **27**, 1528 (1933).
 - 2) *Karström*, Dissertatie Helsingfors (1930).
 - 3) *Dienert*, *Ann. Inst. Pasteur* **14**, 139 (1900).
 - 4) *J. Yudkin*, *Biochem. J.* **26**, 1859 (1932).
 - 5) *Annual Review of Biochemistry*, Vol. II, 494 (1933).
 - 6) *A system of Bacteriology*, Vol. IX, 59 en 60 (1931).
 - 7) *M. Dixon*, *Manometric Methods*, Cambridge 1934.
 - 8) *A. W. Pot*, *Zentr. Bakteriöl. I Abt. Orig.* **125**, 504 (1932); *Ned. Tijdschr. Hyg. Microbiöl. en Serologie* **7**, 132 (1933).
 - 9) *A. W. Pot* en *A. Tasman*, *Zentr. Bakteriöl. I Abt. Orig.* **126**, 348 (1932); *Ned. Tijdschr. Hyg. Microbiöl. en Serologie* **7**, 206 (1933).
 - 10) *A. Tasman* en *A. W. Pot*, *Biochem. Z.* **270**, 349 (1934); *Leeuwenhoek* **1**, 88, 179 (1934).
 - 11) *M. A. Scheffer*, *De suikervergisting door bacteriën der Coligroep*; Diss. Delft 1928.
 - 12) *A. W. Pot* en *A. Tasman*, *Zentr. Bakteriöl. I Abt. Origin.* **130**, 557 (1933); *Ned. Tijdschr. v. Hyg. Microbiöl. en Serologie* **8**, 147 (1934).
 - 13) *A. J. Kluyver*, *The Chemical Activities of Microorganisms*, London 1931.
-

Over de techniek van de bacteriologische diagnose der diphtherie ¹⁾

(met 10 tabellen en 4 figuren in den tekst en 4 microphoto's
buiten den tekst)

DOOR

G. KAPSENBERG.

Terwijl gedurende langen tijd aan het vraagstuk van het aantoonen van diphtheriebacillen in keelslijm e.d., afkomstig van lijders en bacillendragers, weinig aandacht werd besteed — men was vrijwel algemeen tevreden met het Löffler-serum en de kleuring volgens Neisser, Gram en Löffler — is daarin sinds eenige jaren verandering gekomen. Vooral in de Duitsche literatuur werden in den laatsten tijd herhaalde malen de uitkomsten medegedeeld van onderzoekingen, welke ten doel hadden om de morphologische en cultureele eigenschappen van den diphtheriebacil op voedingsbodems van verschillende samenstelling te bestudeeren, ten einde, direct of indirect, op aanwijzing van de verkregen uitkomsten de bacteriologische diagnose te verbeteren en, ook wel, te vergemakkelijken. Op grond van zulke onderzoekingen zijn nieuwe voedingsbodems geconstrueerd. Tegelijkertijd werd aan een reeds oud streven nieuw leven ingeblazen, n.l. aan het streven om de bacteriologische diphtheriediagnostiek in belangrijke mate te vereenvoudigen, door gebruik te maken van een voedingsbodem met sterk electief karakter, op welken bodem de kolonies van den diphtheriebacil zich bovendien door bijzondere kenmerken van de eventueel toch tot ontwikkeling gekomen kolonies van andere bacteriën onderscheiden.

Een en ander gaf mij aanleiding om eens na te gaan, op welke wijze zich, in den loop van den tijd, de techniek van het

¹⁾ Gedeeltelijk voorgedragen in de vergadering van de Ned. Vereeniging voor Microbiologie, gehouden op 11 Juni 1932 te Baarn.

opsporen van diphtheriebacillen in het toegezonden materiaal in het onder mijn leiding staande laboratorium ontwikkeld had. Daarbij bleek, dat geleidelijk ingevoerde, kleinere en grootere wijzigingen, te zamen genomen, aan de toegepaste techniek feitelijk een nieuwe gedaante hadden gegeven. Daar het mij voorkomt, dat de thans bij mij toegepaste methodiek beter is dan de vroeger gebruikte, d.w.z. beter dan de methodiek, welke in de meeste bacteriologische laboratoria thans nog gevolgd wordt, acht ik het raadzaam daarover eenige mededeelingen te doen.

Achtereenvolgens zullen behandeld worden: het keelwatje, de voedingsbodem en de fixatie en kleuring der preparaten.

1. *Het keelwatje.*

*Jvr. Van Riemsdijk*²⁾ heeft er in 1924 de aandacht op gevestigd, dat diphtheriebacillen slecht tegen indroging bestand zijn. Daar de keelwatjes, als ze het laboratorium binnenkomen, een zeer uiteenlopenden graad van vochtigheid vertoonen, van duidelijk vochtig tot geheel droog, stelde *Van Riemsdijk* zich de vraag, of het niet mogelijk zou kunnen zijn, dat tengevolge van de indroging de oorspronkelijk in het slijm aanwezige diphtheriebacillen, vóórdat het onderzoek ingesteld wordt, reeds gestorven zijn. Ter beantwoording van deze vraag ging zij als volgt te werk. De keel van een diphtherielijder of bacillendrager werd met een watje, dat om het einde van een houten staafje gewikkeld was, uitgetreken. Terstond, nadat het keelwatje op het laboratorium was aangekomen, werd het wattenpropje van het staafje afgeschoven en overlangs zoo nauwkeurig mogelijk in twee gelijke en gelijkwaardige helften doorgeknipt. De eene helft werd dadelijk op een plaat met Löffler-serum uitgestreken en deze in de broedstoof gezet. De andere helft van het watje werd in een, door een kurk afgesloten buisje gedaan; vervolgens werd dit buisje, in een kartonnen doosje opgeborgen, gedurende 24 uur op een koele plaats bij kamertemperatuur bewaard. Hierna werd ook dit watje op een Löffler-serumplaat uitgestreken.

Het resultaat van dit onderzoek was het volgende. Na een

²⁾ Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1924. Bd 68, blz. 1402.
Z. f. Hyg. 1924. Bd 103, blz. 106.

verblijf van 24 uur bij 37° werden uit 20 direct op de Löffler-serumplaat uitgestreken helften diphtheriebacillen gekweekt. Van de 20 bijbehorende, doch 24 uur bewaarde helften, konden, op dezelfde wijze onderzocht, slechts uit 15 exemplaren diphtheriebacillen gekweekt worden. De indroging had dus duidelijk schadelijk gewerkt.

Om de indroging tegen te gaan beval *Van Riemsdijk* een tamelijk ingewikkelde methode aan. Het keelvatje moest dadelijk, nadat de keel uitgestreken was, gebracht worden in een nauw buisje, waarin zich een kleine hoeveelheid (1 cc) bevond van een paardenserum-agar-gel, welke volgens een bepaald procédé bereid moest worden. Het aldus tegen uitdroging beschutte keelvatje werd dan in een wijde buis gebracht. Deze buis werd op haar beurt afgesloten door de kurk, waarin het wattenstaafje gestoken was. Aan het indompelen in de gel was bovendien nog dit voordeel verbonden, dat diphtheriebacillen daarin een goeden voedingsbodem zouden vinden en dus reeds gedurende de verzending tot ontwikkeling konden komen. De gel diende dus niet alleen om de uitdroging te voorkomen, maar ook om de diphtheriebacillen op de overige, in het keelslijm aanwezige bacteriën een voorsprong te geven.

A priori scheen mij deze methode, ondanks de voordeelen, welke zij aanbood, niet voor de practijk geschikt. De omvang van de wijde buis; de ietwat gecompliceerde vorm van de kurk; die het wattenstaafje draagt en die verder zoowel het kleine buisje met gel, als de wijde omhullende buis moet afsluiten; het buisje met de niet zoo eenvoudig te bereiden gel, welk buisje, met een kurk afgesloten, los in de groote buis aan de artsen toegezonden moet worden, dat alles lokte mij niet aan om de voorgestelde wijziging van het keelvatje, dat toch zoo eenvoudig mogelijk geconstrueerd moet zijn, over te nemen.

In 1930 heeft *Siestrop*³⁾ de methode van *Van Riemsdijk* aan de practijk getoetst. Het resultaat van zijn onderzoek was niet gunstig. In vele gevallen ontwikkelden zich in de gel allerlei bacteriën, waaronder dikwijls slijmvormende en eiwitvervloeiende soorten, welke de diphtheriebacillen op de Löffler-serumplaat overwoekerden.

Toch kwam het mij voor, dat, al was de remedie, welke

³⁾ Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1930. Bd 74, blz. 4104.

Van Riemsdijk tegen de kwaal aangaf, voor toepassing in de praktijk onbruikbaar, het door haar aangetoonde feit, dat de diphtheriebacillen van de indroging, ook al bevinden zij zich binnen ingedroogd slijm, schade ondervinden, onder de oogen gezien moest worden. Ik moet hierbij opmerken, dat ik met opzet spreek van schade ondervinden. *Van Riemsdijk* heeft namelijk mijns inziens niet aangetoond, dat door indroging bij 5 van de 20 bewaarde keelwatjes de daarin aanwezige diphtheriebacillen werkelijk gestorven waren. Uit haar publicatie blijkt, dat zij de Löffler-serumplaten slechts na 24 uur en niet nogmaals na 2 keer 24 uur onderzocht heeft. Had zij dit wel gedaan, dan zou het best mogelijk geweest zijn, dat zij uit meer dan 15 van de 20 „gedroogde” helften diphtheriebacillen had kunnen kweken. Dit evenwel terzijde latende, dient toch uit de onderzoekingen van *Van Riemsdijk* afgeleid te worden, dat de diphtheriebacillen in het keelslijm ten gevolge van de uitdroging aan het keelvatje schade ondervinden, hetgeen trouwens ook aannemelijk is.

Daarom heb ik, eenige jaren geleden, aan de keelwatjes, welke aan de geneeskundigen ter beschikking worden gesteld, een kleine wijziging aangebracht, welke ontleend is aan de door *Van Riemsdijk* aangegeven methode, en wel door hieraan alles wat overtoollig, gecompliceerd en zelfs schadelijk is, weg te laten.

Fig. 1 laat de eenvoudige wijziging, die het gewone keelvatje ondergaan heeft, zien.

Een toelichting is bijna overbodig. Het essentieele is, dat het met watten omwikkelde gedeelte van het staafje nauw omhuld wordt door een dun buisje. Dit dunne buisje rust op een prop watten, welke onder in een ruimer buisje, van het gewone, geregeld gebruikte formaat, is aangebracht. Het door het keelslijm vochtige vatje sluit zelf het grootste gedeelte van het slijm, dat het opgenomen heeft, van de lucht af, waardoor de uitdroging krachtig tegengewerkt wordt. Acht de geneeskundige het noodig, dan kan hij op de watten, onder in het grootte buisje, eenige druppels water doen. Uitdroging wordt op deze wijze geheel voorkomen.

Het aldus vervormde keelvatje heeft in de praktijk zeer goed voldaan, ook omdat er aan de omhulling door een nauw buisje nog een ander, voor de praktische toepassing niet onbe-

langrijk voordeel verbonden bleek te zijn. Het wattenpropje behoudt namelijk zijn vorm beter. Het is hiermede gesteld als met de wattenprop in een cultuurbuis. De prop krijgt door het steriliseeren binnen een buis tot op zekere hoogte een vaste gedaante. Het gevolg hiervan is, dat uiteengerafelde keelwatjes, welke zoowel het uitstrijken van de keel als het uitstrijken op de plaat bemoeilijken, en daarmede de betrouwbaarheid van het onderzoek verminderen, practisch, sinds de wijziging aangebracht werd, niet meer voorkomen.

Ofschoon de kleine verbetering voor zichzelf spreekt en



Fig. 1. A = kurk. B = cultuurbuisje (lang ongeveer 15 cM.) C = omhullend buisje (lang ongeveer 6.5 cM., inwendige doorsnede ongeveer 7 mM.) D = wattenpropje, aan koperdraad met schroefvormig einde. E = watten.

het feitelijk overbodig schijnt, om nog door een speciaal onderzoek haar beteekenis voor de conserveering der in het keelslijm aanwezige diphtheriebacillen vast te stellen — dagelijks ondervindt men hoeveel vochtiger en in hoe betere conditie de keelwatjes binnenkomen — heb ik toch eenige onderzoekingen ingesteld om na te gaan, of nu inderdaad de diphtheriebacillen in de, op de beschreven wijze beschutte keelwatjes voldoende lang in leven blijven.

Enige, op de gewone wijze aan het laboratorium toegezonden keelwatjes werden, nadat zij op een serumplaat uitgestreken waren, opnieuw met het kleine buisje omhuld en in het groote, door de kurk afgesloten buisje bij kamertemperatuur, in diffuus licht, bewaard. Bleek na 24 uur, dat diphtheriebacillen

op de plaat gegroeid waren, dan werd het bewaarde keelwatje wederom op een plaat uitgestreken. Op deze wijze werd met 12 keelwatjes te werk gegaan. Uit alle twaalf konden na de tweede uitstrijking wederom diphtheriebacillen gekweekt worden; bij 11 gelukte dit reeds na een broedtijd van 24 uur, bij 1 eerst na een verblijf gedurende 2 keer 24 uur in de broedstoof. De na de tweede uitstrijking opgekomen diphtheriebacillen onderscheidden zich niet van die, welke na de eerste gegroeid waren. De diphtheriebacillen hadden dus van het bewaren gedurende 24 uur geen merkbare schade ondervonden.

Op dezelfde wijze werden 12 keelwatjes, nadat het slijm op een plaat was uitgestreken, gedurende 3 dagen bewaard. Het gelukte uit nog 8 van deze keelwatjes, bij 7 reeds na 24 uur, bij het achtste eerst na 2 keer 24 uur, opnieuw diphtheriebacillen te kweken. De „kwaliteit der diagnose”⁴⁾ was eenigszins achteruit gegaan.

Men moet om deze proefnemingen op juiste wijze te beoordeelen enkele niet onbelangrijke bijkomstigheden in aanmerking nemen.

In de eerste plaats werden met voordacht alleen zulke keelwatjes gebruikt, welke op de gewone wijze aan het laboratorium bezorgd waren. Deze keelwatjes konden dus reeds vele uren „oud” geweest zijn, toen zij voor de eerste maal op de serumplaat uitgestreken werden.

In de tweede plaats mag niet uit het oog verloren worden, dat tengevolge van de eerste uitstrijking aan de bewaarde keelwatjes uiteraard veel minder keelslijm kleefde dan oorspronkelijk het geval was. Bij de tweede uitstrijking kwam dus minder keelslijm op de nieuwe plaat.

Aan het feit, dat het keelwatje van de eerste plaat ook een weinig materiaal van den voedingsbodem heeft afgenomen, kan nauwelijks eenige waarde voor de conserveering toegekend worden. In elk geval zal de eventuele gunstige invloed van dit meegenomen materiaal wel te niet gedaan worden door de vermindering van de hoeveelheid keelslijm. Trouwens in 4 keelwatjes, waaraan toch ook eenig materiaal van den eerst gebruikten voedingsbodem kleefde, waren de diphtheriebacillen niet meer aan te toonen. Groot kan de conserveerende werking

⁴⁾ Zie voor dit begrip onder II. De voedingsbodem.

van het medegesleepte materiaal van den voedingsbodem dus zeker niet geweest zijn ⁵⁾).

Op grond van de vermelde proefnemingen en van de gunstige ervaring gedurende eenige jaren kan ik voor de toepassing in de practijk het gebruik van het beschreven keelvatje aanbevelen.

Het behoeft wel nauwelijks opgemerkt te worden, dat de vervaardiging van dit keelvatje zóó weinig meer tijd vraagt, dat daarmede geen rekening gehouden behoeft te worden.

II. De voedingsbodem.

Er behoort zeker eenige zelfoverwinning toe om, nadat in den laatsten tijd eenige nieuwe voedingsbodems voor het opsporen van diphtheriebacillen beschreven zijn, ook over een nieuwen, welke trouwens al eenige jaren oud is, mededeeling te doen. Toch achtte ik dit gewenscht en wel op grond van de volgende overwegingen.

De voor de opsporing van diphtheriebacillen in keelslijm e.d. dienende voedingsbodems kan men in twee groepen verdeelen.

In de eene groep kunnen ondergebracht worden die voedingsbodems, met matige of geringe, in elk geval relatieve electiviteit, waarop de diphtheriebacil zich te midden van andere bacteriën, meer of minder goed, kan ontwikkelen, en wel op zulk een wijze, dat hij eenige kenmerkende eigenschappen verkrijgt, welke door geschikte kleurmethoden zichtbaar gemaakt kunnen worden. Tot deze groep behoort in de eerste plaats het Löffler-serum en verder behooren hiertoe de voedingsbodems van Scharlau ⁶⁾, Lorentz ⁷⁾, Dettling en Schumm ⁸⁾ e.a.

⁵⁾ Het was technisch niet mogelijk om de proef op de wijze, welke Van Riemsdijk toegepast heeft, te nemen. Het wattenpropje laat zich van een staafje met schroefvormig einde niet zóódanig afschuiven, dat het overlangs zuiver in twee helften doorgeknipt kan worden. Het schroefvormige einde dient immers juist om het afschuiven te beletten.

Het zou natuurlijk ook doenlijk geweest zijn, om de keel van een zelfden patiënt met twee keelvatjes uit te strijken en het eene dadelijk en het andere later te onderzoeken. Maar op deze wijze zou de gelijkwaardigheid van beide keelvatjes toch ook niet volstrekt gewaarborgd zijn.

⁶⁾ Z. f. B. O. 1932. Bd 123, blz. 302.

⁷⁾ Z. f. B. O. 1932. Bd 124, blz. 516.

⁸⁾ Z. f. B. O. 1933. Bd 128, blz. 139.

De tweede groep omvat die voedingsbodems, waarbij de electiviteit voor den diphtheriebacil op den voorgrond staat, de morphologische eigenschappen van de tot ontwikkeling gekomen diphtheriebacillen daarentegen meer of minder op den achtergrond treden, terwijl het opsporen van de eventueel opgekomen kolonies van den diphtheriebacil vergemakkelijkt wordt, doordat deze kolonies bijzondere eigenaardigheden gaan vertoonen, waardoor ze zich van die van andere bacteriën, welke overigens slecht of niet op deze voedingsbodems groeien, onderscheiden. Tot deze groep behooren de voedingsbodems met tellurium, zooals die van *Conradi* en *Troch*⁹⁾, *Douglas*⁹⁾, *Pergola*⁹⁾, *Allison* en *Ayling*¹⁰⁾, *Pesch* en *Krämer*¹¹⁾ en in het bijzonder die van *Clauberg*¹²⁾.

Ik geloof, dat beide groepen, beide *soorten* van voedingsbodems, voorloopig althans, recht van bestaan hebben. Beide hebben wel hun goede en hun minder goede eigenschappen. Ook de (tweede) voedingsbodem van *Clauberg*, die als electieve kweekbodem bijzondere voordeelen schijnt aan te bieden, brengt bezwaren mede, zooals omslachtige bereidingswijze, weekheid, korte levensduur der gegoten platen, e.a.

De voedingsbodem, welken ik thans ga beschrijven, behoort tot de eerste groep. Hij is van het Löffler-serum afgeleid. Aan den laatsten voedingsbodem, die voortreffelijke eigenschappen bezit, kleven enkele groote en kleine gebreken. Het voornaamste gebrek is wel de geringe, men kan wel zeggen afwezige electiviteit. Er is nauwelijks een enkele bacterie, die niet op den Löffler-bodem groeien wil, en de meeste der in het keelslijm voorkomende bacteriën ontwikkelen er zich rijkelijk op. Als kleine tekortkomingen kunnen aangemerkt worden, dat het Löffler-serum gemakkelijk door eiwitsplitsende bacteriën **vervloeid** wordt en voorts, dat het een betrekkelijk weke voedingsbodem is. De ondoorzichtigheid, thans ook wel als gebrek genoemd, heeft mij persoonlijk nooit gehinderd. Dat het Löffler-serum slechts zeer betrekkelijk electief is, treedt bij dezen voedingsbodem niet aan het licht, als het te onderzoeken keelslijm afkomstig is van een diphtherie-lijder, of van een bacillen-drager,

⁹⁾ Geciteerd uit Gins in Kolle en Wassermann 1928, Bd V.

¹⁰⁾ Geciteerd uit 11.

¹¹⁾ Z. f. B. O. 1930. Bd 116, blz. 518.

¹²⁾ Z. f. B. O. 1931. Bd 120, blz. 324.

die veel diphtheriebacillen in zijn keel herbergt; indien dus in het te onderzoeken slijm veel diphtheriebacillen aanwezig zijn. Dan komen de diphtheriebacillen op de Löffler-serumplaat overvloedig tot ontwikkeling, zelfs in vrijwel reine cultuur. Maar onder zulke omstandigheden leidt feitelijk elke, niet bepaald ongeschikte voedingsbodem tot het beoogde doel. Een goede voedingsbodem moet echter ook dan de diphtheriebacillen tot groei doen komen, als deze slechts in een klein aantal te midden van andere bacteriën aanwezig zijn. Hierin schiet het Löffler-serum dikwijls te kort. Vooral dan, als de vergezellende bacteriën tot de krachtig groeiende behooren, kunnen de diphtheriebacillen geheel overwoekerd worden.

Ik heb mij nu afgevraagd, of het niet mogelijk zou zijn om aan het Löffler-serum de eigenschap, waardoor het voor vrijwel elke bacterie een rijke voedingsbodem is, te ontnemen, zonder dat de groei van den diphtheriebacil daardoor belemmerd en zonder dat de ontplooiing van zijn kenmerkende morphologische eigenschappen er door geschaad werd. Op deze wijze zou weliswaar geen echte electieve voedingsbodem verkregen worden, maar toch wel zulk een, waarop de diphtheriebacillen voor overwoekering door andere bacteriën minder gevaar zouden loopen.

De oorzaak van den rijkelijken bacterie-groei op het Löffler-serum is wel gelegen in de toevoeging van glucosebouillon. Hierop heeft reeds Roux¹³⁾ de aandacht gevestigd, toen hij het Löffler-serum verving door gestold serum, zonder eenige toevoeging. Inderdaad is gestold serum voor de bacteriologische diagnose der diphtherie een niet ongeschikte voedingsbodem. Het heeft echter, ook volgens mijn ervaring, de groote fout, dat de diphtheriebacil er somtijds alleen korte staafjes op vormt en vooral, dat de poollichaampjes binnen de diphtheriebacillen dikwijls slecht ontwikkeld zijn, niet zelden er geheel in ontbreken.

Aangezien de toevoeging van 1 deel bouillon, waarin 1% glucose aanwezig is, aan 3 deelen serum er toe leidt, dat het Löffler-serum een gehalte van $\frac{1}{4}$ % glucose bezit, heb ik, in het begin van 1920, eenige vergelijkende proeven genomen, ten

¹³⁾ Zie Macé, *Traité pratique de Bactériologie*. T. I., 1912, blz. 830 en 831.

einde na te gaan, of gestold serum, dat $\frac{1}{4}\%$ glucose bevatte (aan 100 cc vloeibaar serum werd dus vóór de stolling 250 mgr. glucose toegevoegd) niet een geschikte voedingsbodem zou zijn.

De volgende proef uit dien tijd moge hier vermelding vinden. Het zelfde keelwatje met keelslijm werd telkens op 3 platen uitgestreken, namelijk:

1e. op een plaat met runderserum;

2e. op een plaat met hetzelfde serum, waaraan echter $\frac{1}{4}\%$ glucose toegevoegd was;

3e. op een plaat, eveneens met hetzelfde serum, dat evenwel 3 vol. % glycerine bevatte.

Van 50 op dusdanige wijze onderzochte keelwatjes werden er door het runderserum zonder eenige toevoeging 20, door het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum 23 en door het glycerine-serum 21 als positief aangegeven.

Het zal wellicht bevreemding wekken, dat als derde plaat niet Löffler-serum, maar glycerine-serum gebruikt werd. Tot toelichting moge het volgende dienen. Tijdens mijn assistentschap bij de Vergelijkende Pathologie, onder wijlen *Prof. De Jong*, werd voor de diphtherie-onderzoekingen steeds glycerine-serum gebruikt. Zooals bekend is, heeft *De Jong* veel over tuberculose gewerkt. De stammen van tuberkelbacillen werden steeds op glycerine-serum voortgekweekt. Er was dus voortdurend glycerine-serum in zijn laboratorium aanwezig. Het was hem nu gebleken, dat dit serum zich ook zeer goed voor het kweken van diphtheriebacillen uit keelslijm leende. Destijds heb ik, in opdracht van *De Jong*, vergelijkende (niet gepubliceerde) onderzoekingen ingesteld en daaruit kunnen vaststellen, dat glycerine-serum beter dan Löffler-serum was, omdat er meer positieve resultaten dan met het laatste mede verkregen werden. Er werd dus door mij ter vergelijking niet Löffler-serum, maar glycerine-serum genomen, omdat dit — althans wat het aantal positieve uitkomsten aangaat — het Löffler-serum overtreft. Ik moet hierbij echter opmerken, dat de toepassing van het glycerine-serum mij persoonlijk toch nimmer geheel bevredigd heeft, omdat de poollichaampjes, hoewel meestal in flinken getale en krachtige tot ontwikkeling gekomen, niet zelden abnormale vormen vertoonden, waarmede dan dikwijls een misvormd bacterieelijf gepaard ging. Daarom heb ik er — toen mij in 1919 de leiding van een bacteriologisch laboratorium toevertrouwd

was — naar gestreefd om een voedingsbodem te vinden, welke beter dan het gebruikte glycerine-serum was.

Daar nu het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum niet slechts het normale, maar ook het glycerine-serum ten aanzien van het aantal verkregen positieve uitkomsten overtrof, en het bovendien de diphtheriebacillen op morphologisch typische wijze tot ontwikkeling bracht, heb ik, nadat nog eenige aanvullende waarnemingen gedaan waren, in 1920, het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum voor de diphtherie-onderzoekingen in het laboratorium van den dienst ingevoerd. Afgescheiden van zijn, in vergelijking met die van het Löffler-serum grootere electiviteit — wel een gevolg daarvan, dat de vergezellende bacteriën er minder goed op groeien — bezit het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum boven het Löffler-serum nog drie kleine voordeelen, namelijk grootere vastheid, zeer eenvoudige bereiding en goedkoopte.

Voor de volledigheid zij nog opgemerkt, dat — hetgeen voor de hand lag — ook onderzoekingen ingesteld werden, om de vraag te beantwoorden of de toevoeging van pepton-Witte aan serum ook in staat was dit tot een meer geschikten voedingsbodem voor de diphtheriediagnose te maken. Het Löffler-serum bevat toch door de toevoeging van bouillon ook pepton en wel, daar bouillon 1% bevat, in een hoeveelheid van $\frac{1}{4}\%$. Het bleek nu, dat de toevoeging van pepton geenerlei voordeelen had. Integendeel leverden de proeven het merkwaardige resultaat op, dat de vorming van poollichaampjes door pepton-Witte tegengewerkt wordt. Reeds bij toevoeging van $\frac{1}{4}\%$ pepton aan serum (in 100 cc serum wordt dus vóór de stolling 250 mgr. pepton opgelost) kan men waarnemen, dat de poollichaampjes, zoowel wat aantal als grootte betreft, een vermindering vertoonen. Bij een concentratie van 1% pepton is de schadelijke werking zeer duidelijk; als 2% pepton toegevoegd wordt, vertoonen de meeste diphtheriebacillen geen poollichaampjes meer, terwijl, indien het serum 3 en meer % pepton bevat, de poollichaampjes practisch geheel ontbreken. Toch wordt de groei door de toevoeging van pepton niet merkbaar gestoord. Ook *Lorentz*¹⁴⁾ heeft onlangs gevonden, dat pepton aan de ontwikkeling der poollichaampjes niet bevorderlijk is.

Over den invloed van de extraktiefstoffen, die zich in de

¹⁴⁾ Z. f. B. O. 1931. Bd 120, blz. 336.

bouillon bevinden, heb ik geen onderzoeken ingesteld ¹⁵⁾.

Het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum is gedurende meer dan 10 jaren in het laboratorium van den dienst met goed gevolg in gebruik geweest. Ook elders heeft men dit serum voor de bacteriologische diphtheriediagnostiek overgenomen.

Nu nog kan ik het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum als een voedingsbodem, welke boven het Löffler-serum de voorkeur verdient, aanbevelen.

Toch bevredigde deze voedingsbodem mij niet geheel en al. Het kwam nu en dan voor, dat de poollichaampjes zich gebrekkig ontwikkeld hadden en ook gebeurde het, hoewel zeer zelden, dat de poollichaampjes zelfs geheel ontbraken. Hetzelfde ondervindt men trouwens ook, en in niet geringere mate, bij het gebruik van Löffler-serum. Het scheen mij gewenscht toe om te trachten, het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum op zóódanige wijze te verbeteren, dat onvoldoende poollichaampjes-vorming voorkomen werd.

Daarvoor werden in den loop van eenige jaren vergelijkende onderzoeken verricht, welke ten slotte geleid hebben tot de samenstelling van een zeer bevredigenden voedingsbodem. Omtrent deze onderzoeken wil ik thans enkele samenvattende mededeelingen doen.

Met betrekking tot al deze onderzoeken geldt het volgende. Voor de bereiding van de te vergelijken voedingsbodems werd steeds hetzelfde runderserum aangewend. De stolling der voedingsbodems van verschillende samenstelling geschiedde steeds tegelijkertijd, in hetzelfde toestel (hetwelk op blz. 178 en 179 nader beschreven wordt). Bij de proeven werden steeds en uitsluitend de aan het laboratorium ter onderzoek toegezonden keelwatjes gebruikt, opdat de omstandigheden van meet aan

¹⁵⁾ Bij de onderzoeken, welke ik verricht heb, is mij ook gebleken, welk een gelukkigen greep Löffler deed, toen hij het serum met bouillon mengde. Het hiermede verdunde serum wordt namelijk bij de stolling behoorlijk vast. Vervangt men echter de bouillon door dezelfde hoeveelheid water of zelfs door dezelfde hoeveelheid water, die $\frac{1}{2}\%$ keukenzout bevat, dan blijft het aldus verdunde serum na de stolling tamelijk week, weeker dan het Löffler-serum. Het zijn wel de gezamenlijke stoffen in de bouillon, welke aan het Löffler-serum zijn betrekkelijk groote vastheid geven.

Uit enkele proeven is gebleken, dat de toevoeging van water aan serum met of zonder glucose geen voordeel aanbiedt, wel een nadeel, grootere weekheid.

met die van de dagelijksche practijk overeen zouden stemmen. De keelwatjes waren afkomstig van diphtherielijders, van bacillendragers, van personen, die waarschijnlijk of mogelijk aan diphtherie leden, en van personen (meestal kinderen) uit de omgeving van een diphtherie-patiënt. „Massa”-onderzoekingen werden derhalve voor de vergelijkende proefnemingen buitengesloten. Dusdanige onderzoekingen hierbij te betrekken zou weinig zin gehad hebben. In de eerste plaats is het bij een zeer groot aantal platen en preparaten niet goed mogelijk om zich door rustige en nauwkeurige vergelijking een juist oordeel te vormen. In de tweede plaats zou het groote aantal der negatieve uitkomsten veel nutteloos werk medegebracht hebben. Door deze betrekkelijke selectie wordt het soms hooge getal der positieve uitkomsten bij de voor de vergelijking gebruikte keelwatjes verklaard. De platen werden bewust op dusdanige wijze met het keelwatje bestreken, dat op iedere plaat, zoo nauwkeurig dit mogelijk was, dezelfde hoeveelheid materiaal gebracht werd. De volgorde, volgens welke de strepen met een keelwatje op de vergelijkingsplaten gezet werden, wordt door fig. 2 schematisch aangegeven. Regelmatig werd ook van beginplaat gewisseld, d.w.z. den eenen keer werd met de plaat met

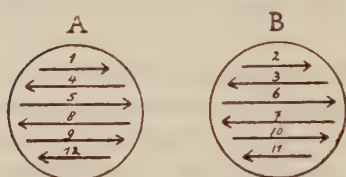


Fig. 2.

De cijfers geven de volgorde aan volgens welke de strepen op de vergelijkingsplaten A en B werden aangebracht.

voedingsbodem A, den anderen keer met de plaat met voedingsbodem B begonnen. De preparaten werden steeds door dezelfde analyste¹⁶⁾ op zooveel mogelijk gelijke wijze gemaakt en gekleurd. De te vergelijken preparaten werden steeds door mijzelf bestudeerd en beoordeeld. Van elke proef werden korte aantekeningen gemaakt en wel aangaande de groei-intensiteit op de verschillende voedingsbodems (dikte der beslagen) en omtrent het karakter der staafjes in het Neisser- en in het Grampreparaat (lengte der staafjes, vorm en aantal der poollichaampjes, duidelijkheid van den corynebacterie-vorm). Ook

¹⁶⁾ Mej. A. M. R. Croon, aan wie ik hierbij voor de zorgvuldige uitvoering van het eentonige werk mijn dank betuig.

wanneer het aantal der in het eene preparaat aanwezige diphtheriebacillen aanzienlijk tegen het aantal in het andere preparaat afstak, werd dit in aanmerking genomen. Ten einde voorts een zoo objectief mogelijk overzicht te verkrijgen, werden, naar een te voren opgesteld schema, beoordeelingscijfers gegeven, stijgende van 0 tot 4, en wel voor de „kwaliteit der diagnose”, de „kwaliteit der poollichaampjes” en de „groei-intensiteit”.

De beoordeeling van de kwaliteit der poollichaampjes geschiedde overeenkomstig de volgende beginselen. Geen poollichaampjes: 0; weinig of nauwelijks te onderkennen poollichaampjes: 1; duidelijke, doch fijne, kleine poollichaampjes in de meeste staafjes: 2; duidelijke, flinke poollichaampjes, praktisch in elken bacil: 3; groote, forsche, regelmatige, ronde of ovale poollichaampjes in alle staafjes: 4.

Ter bepaling van de kwaliteit der diagnose werd behalve op het karakter der poollichaampjes ook op andere kenmerken van den diphtheriebacil gelet. De cijfers werden op de volgende wijze gegeven. Geen diphtheriebacillen gevonden, terwijl deze toch ingevolge de positieve uitkomst op de vergelijkingsplaat in het keelslijm aanwezig waren: 0; geen of spaarzame, resp. gebrekkige poollichaampjes, staafjes kort, in het Grampreparaat niet heelemaal duidelijk als corynebacterie te onderkennen: 1; goede, doch fijne poollichaampjes, staafjes tamelijk kort, echter met voldoende zekerheid als corynebacterie te diagnostiseeren: 2; krachtige, duidelijke poollichaampjes in bijna alle staafjes, welke laatste voor het meerendeel slank zijn en den typischen corynebacterie-vorm vertoonen: 3; fraaie, groote, zeer talrijke poollichaampjes in slanke staafjes, welke zich volledig als typische corynebacteriën ontwikkeld hebben: 4.

De groei-intensiteit, van geen groei tot overvloedigen groei, was natuurlijk betrekkelijk gemakkelijk in cijfers uit te drukken.

Het behoeft wel nauwelijks vermeld te worden, dat het somtijds moeilijk was om het meest juiste cijfer te treffen. Niet zelden moest met 0.5 geïnterpoleerd worden om kleine verschillen (zooals bijv. meer diphtheriebacillen in het preparaat; iets dikkere beslagen op de plaat) tot hun recht te doen komen. Alles bij elkander genomen heeft deze wijze van werken mij bevredigd.

Uiteraard kan en mag aan de cijfers slechts een betrekkelijke waarde toegekend worden. Zij dienden slechts ter vergelijking bij de proefnemingen. Aan verschillen tusschen de cijfers, welke op denzelfden voedingsbodem betrekking hebben, maar voorkomen in verschillende tabellen, mag geen beteekenis worden toegekend. De waarde der cijfers ligt uitsluitend in de er door geschapen mogelijkheid van vergelijking en verkrijging van gemiddelden.

Van de bij elke proef gegeven cijfers werden lijsten aangelegd; de cijfers werden opgeteld en door deeling werden de gemiddelden bepaald. Het zijn deze gemiddelde cijfers, welke in de te bespreken tabellen onder de hoofden „gemiddelde kwaliteit der diagnose”, „gemiddelde kwaliteit der poollichaampjes” en „gemiddelde groei-intensiteit” vermeld worden.

Van de platen werden zoowel na 24 uur ¹⁷⁾ als na 2×24 uur bebroeding bij 37° preparaten gemaakt. Niet alleen werden dus de na 1×24 uur nog negatieve platen, maar ook de na 1×24 uur reeds positieve wederom in de broedstoof geplaatst. Dit laatste geschiedde om de eventueele, op de diphtheriebacillen door de andere, in het keelslijm aanwezige bacteriën uitgeoefende antagonistische werking nader te bestudeeren. Hoe langer de bebroedingstijd, des te duidelijker zullen uiteraard antagonistische factoren aan het licht kunnen treden. Het is zeer goed in te denken, dat na 1×24 uur op de voedingsbodems, die met elkander vergeleken worden, van antagonistische invloeden nog weinig te bespeuren is, maar dat deze na 2×24 uur zeer goed waarneembaar zijn. Daaruit mag dan, als er een verschil opgemerkt kan worden, de gevolgtrekking gemaakt worden, dat bijv. op den eenen voedingsbodem antagonistische werkingen zich niet of nauwelijks ontplooien kunnen, terwijl deze zich op den anderen voedingsbodem daarentegen duidelijk openbaren.

In het bijzonder bij het Löffler-serum is het eenige malen voorgekomen, dat bij een, na 1×24 uur goed positieve plaat, na 2×24 uur slechts gebrekkige, gedegeneerde, soms zelfs ook heelemaal geen diphtheriebacillen in de preparaten waargenomen konden worden. Hieruit volgt — hetgeen voor de

¹⁷⁾ D.w.z. op den morgen, volgende op den dag van de beënting der platen.

practijk van gewicht is — dat een plaat steeds na 24 uur *moet* nagekeken worden en dat het ongeoorloofd is, om, als het bijv. een herhaald onderzoek bij een bacillendragers betreft en het preparaat op een rust- of feestdag gemaakt moet worden, het maken tot den volgenden dag uit te stellen.

Het wordt thans wel algemeen noodzakelijk geacht om een plaat, die na 1×24 uur nog negatief is, na een verblijf van 2×24 uur in de broedstoom nogmaals te onderzoeken. Op zulk een plaat zullen de omstandigheden met betrekking tot de antagonistische invloeden jegens den diphtheriebacil in den regel van een eenigszins ander karakter zijn, dan op een plaat, die reeds na 24 uur positief was. Op de na 24 uur nog negatieve plaat zijn de na 2×24 uur opgekomen diphtheriebacillen feitelijk eerst 24 uur oud. Zij hebben eventueele remmende invloeden overwonnen en antagonistische werkingen hebben nog niet, of slechts gedurende korten tijd, gelegenheid gehad om zich te doen gelden. Daarom kan aan de cijfers, welke van deze platen in de tabellen weergegeven zijn, niet dezelfde beteekenis worden toegekend als aan die, welke na 2×24 uur verkregen werden bij de platen, die reeds na 24 uur positief waren; trouwens ook niet vanwege het kleine aantal platen, waarop zij betrekking hebben. Alleen dan, als dit aantal eenigszins groot was, is er bij de bespreking van de tabellen gebruik van gemaakt.

Voor ik de inleidende en inlichtende, algemeene bespreking besluit, om over te gaan tot de behandeling der uitkomsten van de vergelijkende onderzoekingen, acht ik het nog gewenscht om over een niet onbelangrijke ervaring mededeeling te doen. Het ligt op het eerste gezicht voor de hand, om bij het verzamelen van materiaal voor een preparaat groote, en in het bijzonder slijmige kolonies te vermijden, omdat men — uiteraard met reden — van meening is, dat deze geen kolonies van diphtheriebacillen kunnen zijn. Op zichzelf is dit volkomen juist, maar deze kolonies, en in het bijzonder de slijmige, zijn herhaaldelijk niet rein en kunnen — en dit is van groot belang — met name diphtheriebacillen bevatten. Slijmvormende staven (een nauwkeurige vaststelling van geslacht en soort heb ik nimmer beproefd) kunnen zelfs als voedsterbacteriën voor den diphtheriebacil optreden. In het preparaat van een slijmkolonie kan men, te midden van (meestal Gram-negatieve) plompe staven, de mooiste diphtheriebacillen aantreffen. Op deze wijze

heb ik bij twee bacillendraagsters, die aan diphtherie geleden hadden, nog diphtheriebacillen kunnen aantoonen, hoewel elders de afwezigheid daarvan met beslistheid was vastgesteld. In beide gevallen betrof het personen, die veel met kleine kinderen in aanraking kwamen. Als dus op een plaat kolonies te voorschijn gekomen zijn, welke op grond van haar uiterlijk zeker niet door diphtheriebacillen opgebouwd zijn, dan moet men toch een preparaat daarvan maken; ze kunnen diphtheriebacillen herbergen. In den allerlaatsten tijd heeft ook *Polónyi*¹⁸⁾ soortgelijke, door hem gedane waarnemingen vermeld.

Ten einde een zoo goed mogelijke vergelijking en tevens een sluitende bewijsvoering te verkrijgen, werd in de reeks der vergelijkende onderzoeken wederom het Löffler-serum opgenomen.

In de eerste plaats moge een tabel besproken worden, welke de uitkomsten van de vergelijking van Löffler-serum met $\frac{1}{4}$ % glucose-serum weergeeft.

TABEL 1.

Löffler-serum, tegenover $\frac{1}{4}$ % glucose-serum.

32 positieve keelwatjes (op 77 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei-intensiteit	
	Löffler-serum	$\frac{1}{4}$ % glucose-serum	Löffler-serum	$\frac{1}{4}$ % glucose-serum	Löffler-serum	$\frac{1}{4}$ % glucose-serum	Löffler-serum	$\frac{1}{4}$ % glucose-serum
1 × 24 u.	19	22	2.7 (2.3) ¹⁾	2.6	2.3	2.4	2.2	1.6
2 × 24 u.	8	10	1.7	2.4	1.4	2.—	3.5	2.5
Samen	27	32						
Verhoudingscijfers bij de 32 positieve keelwatjes na 2 x 24 u.			2.2 (1.8) ¹⁾	2.6	1.8	2.1	3.4	2.5

¹⁾ Het eerste getal is het gemiddelde beoordeelingscijfer van de positieve uitkomsten, als de negatieve uitkomsten, die positief hadden moeten zijn, niet medegeteeld worden. Het tusschen haakjes geplaatste getal is het gemiddelde beoordeelingscijfer, dat verkregen wordt, als de vermelde negatieve uitkomsten, met 0 beoordeeld, medegerekend worden.

Uit deze tabel kan het volgende afgeleid worden. Van de

¹⁸⁾ Z. i. B. O. 1935. Bd 133, blz. 471.

in totaal 32 positieve uitkomsten werden er slechts 27 met het Löffler-serum verkregen. Na 24 uur had het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum op het Löffler-serum reeds een voorsprong van 3 positieve uitkomsten. De 10, na 24 uur nog negatieve platen met glucose-serum waren alle na 2×24 uur positief. Van de 13, na 24 uur nog negatieve Löffler-serumplaten leverden er na 2×24 uur slechts 8 een positief resultaat op. Derhalve werd opnieuw bevestigd, wat reeds vroeger bewezen was, dat het aantal positieve uitkomsten bij het $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum beslist grooter is dan bij het Löffler-serum.

Een verklaring hiervoor is wel daarin gelegen, dat antagonistische invloeden op het glucose-serum minder dan op het Löffler-serum tot uiting kunnen komen. Dit blijkt in de eerste plaats uit de gemiddelde groei-intensiteit, die bij het Löffler-serum duidelijk grooter dan bij het glucose-serum is: na 24 uur 2.2 tegen 1.6; na 2×24 uur 3.4 tegen 2.5. Verder blijkt dit ook uit de cijfers voor de gemiddelde kwaliteit der diagnose. Na 24 uur is deze bij de glucose-serum- en de Löffler-serumplaat vrijwel gelijk, n.l. 2.6 en 2.7. Deze voor het Löffler-serum gunstige verhouding verkrijgt men echter alleen dan, als men de negatieve uitkomsten, welke evenwel, gezien de positieve uitkomst op de bijbehorende vergelijkingsplaat, positief hadden moeten zijn, niet medetelt en dus alleen de positieve uitkomsten voor beoordeeling in aanmerking doet komen. Rekent men echter ook de negatieve uitkomsten, die dus met 0 beoordeeld werden, mede, dan wordt de verhouding glucose-serum: Löffler-serum $2.6 : 2.3^{19)}$. Ofschoon het Löffler-serum op zichzelf een geschikte voedingsbodem is, waarop de diphtheriebacillen zeer goed gedijen, kan deze goede eigenschap ten gevolge van de overwoekering door de vergezellende bacteriën, en ten gevolge van de daarvan uitgaande antagonistische in-

¹⁹⁾ Misschien is het gewenscht den gevolgden gedachtengang nog nader toe te lichten. Na 24 uur waren 19 Löffler-serumplaten en 22 glucose-serumplaten positief. De som der beoordeelingscijfers van de 19 Löffler-serumplaten bedroeg 51, dus was het gemiddelde $51 : 19 = 2.7$. Bij de 22 glucose-serumplaten bedroeg de som 58 en derhalve het gemiddelde $58 : 22 = 2.6$. Men moet echter in aanmerking nemen, dat er in feite 22 positieve uitkomsten werden verkregen en dat mitsdien de 3 negatieve Löffler-serumplaten, omdat hiertegenover 3 positieve glucose-serumplaten staan, met 0 beoordeeld moeten worden, waaruit volgt, dat het gemiddelde voor het Löffler-serum streng genomen niet $51 : 19$, maar $51 : 22 = 2.3$ is.

vloeden herhaalde malen niet tot haar recht komen. Dat tegenwerkende factoren op de Löffler-serumplaat aanwezig zijn, blijkt vooral na 2×24 uur. Dan is de gemiddelde kwaliteit der diagnose bij het Löffler-serum 2.2 (1.8) tegen 2.6 bij het glucose-serum.

Den schadelijken invloed, die op het Löffler-serum op de diphtheriebacillen uitgeoefend wordt, kan men ook aan de poollichaampjes waarnemen: na 24 uur zijn de beoordelingscijfers daarvoor bij Löffler- en glucose-serum practisch gelijk: resp. 2.3 en 2.4, maar na 2×24 uur komt bij het Löffler-serum een veel duidelijker achteruitgang dan bij het glucose-serum naar voren: 1.8 tegen 2.1.

Samenvattend werd dus het volgende vastgesteld:

Het $\frac{1}{4}$ % glucose-serum is voor de opsporing van diphtheriebacillen in keelslijm e.d. beter geschikt dan het Löffler-serum. Het aantal positieve uitkomsten, dat het oplevert, is beslist groter. Dit betere resultaat is het gevolg daarvan, dat de verzeggende bacteriën op het glucose-serum in mindere mate groeien, waardoor antagonistische werkingen minder tot uiting komen. De morphologische kenmerken (poollichaampjesvorming, ontwikkeling als corynebacterie) der diphtheriebacillen, welke binnen 24 uur uit keelslijm e.d. op het glucose-serum opgekomen zijn, stemmen vrijwel overeen met die, welke de, in denzelfden tijd op de Löffler-serumplaat tot ontwikkeling gekomen diphtheriebacillen vertoonen. Na 2×24 uur is de toestand echter veranderd. Op de glucose-serumplaat hebben de diphtheriebacillen duidelijk in mindere mate schade geleden dan op de Löffler-serumplaat.

Alles bijeengenomen kan dus herhaald worden, dat het $\frac{1}{4}$ % glucose-serum boven het Löffler-serum als voedingsbodem voor de bacteriologische diagnose der diphtherie te verkiezen is.

Toch werd, om de op blz. 153 reeds vermelde reden, getracht, het glucose-serum te verbeteren en wel in deze richting, dat, zonder aan de betrekkelijke electiviteit afbreuk te doen, de vorming van poollichaampjes en tevens de ontwikkeling van den langen corynebacterie-vorm bij de opgekomen diphtheriebacillen bevorderd zou worden. Hierdoor zou toch niet alleen het stellen van de diagnose vergemakkelijkt, maar tevens ook de

afgrenzing tegenover pseudo-diphtheriebacillen beter gewaarborgd worden. Want weliswaar vertoonen de op het glucose-serum uit het keelslijm gegroeide diphtheriebacillen hun kenmerkende eigenschappen over het algemeen op duidelijke wijze — op zijn minst zoo goed als op het Löffler-serum — toch komt het ook bij het glucose-serum somtijds voor, dat de diphtheriebacillen weinig of geen poollichaampjes gevormd hebben, of zeer kort zijn.

Het lag voor de hand om een kleine hoeveelheid glycerine aan het glucose-serum toe te voegen. Immers vroeger had ik reeds waargenomen, dat glycerine aan serum toegevoegd, de ontwikkeling van poollichaampjes bevorderde. Het zou mogelijk zijn, dat door de toevoeging van een kleine hoeveelheid glycerine de gunstige invloed hiervan merkbaar was, zonder dat de degeneratieve werking, die bij de vrij groote concentratie (3 vol. %) van het glycerine in het voor de kweeking van tuberkelbacillen gebruikte serum waargenomen werd, te voorschijn kwam.

Een kleine reeks proeven, waarbij $\frac{1}{4}$ % glucose-serum vergeleken werd met denzelfden voedingsbodem, die echter behalve de $\frac{1}{4}$ % glucose bovendien $\frac{1}{4}$ vol. % glycerine bevatte, leverde geen evidente resultaten op. Wel was de vorming van poollichaampjes op den laatsten bodem wat krachtiger, doch deze verbetering trad meestal niet reeds binnen 24 uur, doch eerst na 2×24 uur in. In deze richting is daarom het onderzoek niet voortgezet.

Thans werd, op grond van overwegingen van empirischen aard, nagegaan of de toevoeging van eidooier wellicht tot het beoogde doel zou kunnen leiden. Aan deze overwegingen lag de gedachte ten grondslag, dat er verwantschap bestaat tusschen het corynebacterium diphtheriae en het mycobacterium tuberculosis. Glycerine werkt gunstig op de ontwikkeling van beide microorganismen. Daar nu de tuberkelbacil op voedingsbodems met eidooier zoo goed gedijt, werd de mogelijkheid gesteld, dat eidooier eveneens op de ontwikkeling van den diphtheriebacil een gunstigen invloed zou kunnen uitoefenen, in het bijzonder op de vorming van de poollichaampjes. Om dit te onderzoeken werd het $\frac{1}{4}$ % glucose-serum met opklimmende hoeveelheden dooiermassa van kippeneieren bedeed, waarna de aldus verkregen voedingsbodems met $\frac{1}{4}$ % glucose-serum zonder dooier,

op de beschreven wijze beoordeeld en vergeleken werden. Onderzocht werd de toevoeging van 2, 3, 4, 5, 6 en 8 vol. % dooiermassa.

Het zou te veel en onnoodige plaatsruimte vorderen, indien alle hierbij behorende tabellen afgedrukt werden. Als uitkomst werd verkregen, dat de toevoeging van 3 tot 6 vol. % dooier een duidelijke verbetering bewerkstelligde. Bij een concentratie van 8% dooier werd geen verbetering opgemerkt, eerder een geringe achteruitgang. De beste concentratie bleek die van 3 en 4% te zijn. De tabellen 2 en 3 mogen hieromtrent een indruk geven.

TABEL 2.

$\frac{1}{4}$ % glucose-serum, tegenover $\frac{1}{4}$ % glucose-serum met 3 vol. % dooier.

38 positieve keelwatjes (op 134 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei- intensiteit	
	zonder dooier	met 3% dooier	zonder dooier	met 3% dooier	zonder dooier	met 3% dooier	zonder dooier	met 3% dooier
1 × 24 u.	30	32	2.2 (2.-) ¹⁾	3.1	2.—	2.9	1.3	1.5
2 × 24 u.	7	5	2.—	2.2	2.1	2.2	1.8	1.7
Samen	37	37						
Verhoudingscijfers bij de 38 positieve keelwatjes na 2 x 24 u.			2.5 (2.4) ¹⁾	2.9 (2.8) ¹⁾	2.2	2.8	2.1	2.3

TABEL 3.

$\frac{1}{4}$ % glucose-serum, tegenover $\frac{1}{4}$ % glucose-serum met 4 vol. % dooier.

38 positieve keelwatjes (op 108 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei- intensiteit	
	zonder dooier	met 4% dooier	zonder dooier	met 4% dooier	zonder dooier	met 4% dooier	zonder dooier	met 4% dooier
1 × 24 u.	24	24	2.3 (2.2) ¹⁾	2.6 (2.5) ¹⁾	1.7	2.3	1.1	1.2
2 × 24 u.	11	11	2.1	2.7	2.—	2.5	2.3	2.3
Samen	35	35						
Verhoudingscijfers bij de 38 positieve keelwatjes na 2 x 24 u.			2.4 (2.2) ¹⁾	2.9 (2.7) ¹⁾	2.—	2.5	2.1	2.4

¹⁾ Zie de noot onder tabel 1.

Uit beide tabellen blijkt, dat het totale aantal positieve uitkomsten bij $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum, zonder en met 3, resp. 4% dooier, hetzelfde blijft. Wellicht is dienaangaande de toevoeging van 3% iets gunstiger dan die van 4%, want na 24 uur werden bij het glucose-serum met 3% dooier meer positieve uitkomsten dan met het glucose-serum zonder dooier verkregen (Tabel 2).

Het zal allicht eenige bevreemding wekken, dat de totalen der positieve uitkomsten in beide tabellen niet overeenkomen met de aantallen positieve keelwatjes. Dit verschil is het gevolg daarvan, dat het voorgekomen is, dat slechts op één der voor de vergelijking dienende voedingsbodems diphtheriebacillen gevonden zijn. Dit kan op verschillende wijzen verklaard worden. In de voornaamste plaats wel hierdoor, dat op de eene plaat te weinig of geen diphtheriebacillen gekomen zijn; want ofschoon er naar gestreefd werd op elke plaat zooveel mogelijk dezelfde hoeveelheid keelslijm te brengen, zoo is het toch onvermijdelijk, dat steeds een eerste streep op een eerste plaat aangebracht wordt, en dus een tweede plaat bestreken wordt met een keelwatje, waaraan door de uitstriking op de eerste plaat een grooter of kleiner deel van het keelslijm ontnomen is. De invloed van deze fout wordt echter verminderd, omdat telkens van eerste plaat gewisseld werd, waardoor de fout dus voor de met elkander te vergelijken voedingsbodems ongeveer op dezelfde hoogte werd gebracht. Daarom mag uit beide tabellen afgeleid worden, dat de toevoeging van dooiermateriaal het aantal positieve uitkomsten niet vergroot.

Winst is echter gelegen in de betere morphologische kenmerken, welke de diphtheriebacillen op de glucose-dooier-serumplaten vertoonen, met name in de rijkere vorming van, tevens mooiere, poollichaampjes. De gemiddelde kwaliteit der poollichaampjes, beoordeeld na 24 uur, is door de toevoeging van dooier gestegen van 2 tot 2.9 (tabel 2) of van 1.7 tot 2.3 (tabel 3). Ook na 2×24 uur komt dit tot uiting: toeneming van 2.2 tot 2.8, resp. van 2.- tot 2.5. De gemiddelde kwaliteit der diagnose is op gelijke wijze verbeterd: na 24 uur van 2.2 (2.-) tot 3.1; na 2×24 uur van 2.5 (2.4) tot 2.9 (2.8) (tabel 2), of van 2.3 (2.2) tot 2.6 (2.5) en van 2.4 (2.2) tot 2.9 (2.7) (tabel 3).

De groei-intensiteit wordt door de toevoeging van dooier iets bevorderd. Bij het glucose-serum is het cijfer na 2×24

uur 2.1, bij het glucose-dooier-serum 2.3, resp. 2.4.

De vraag werd thans gesteld, of het, nu het serum dooier bevatte, nog wel noodig was, dat aan den voedingsbodem tevens glucose toegevoegd werd. Om dit uit te maken werd een proef ingesteld met twee voedingsbodems, welke beide 3 vol. % dooier bevatten (volgens tabel 2 is 3% het meest geschikte percentage), doch dáárin van elkander verschilden, dat aan den eenen $\frac{1}{4}$ % glucose en aan den anderen niets toegevoegd was. Tabel 4 vermeldt de resultaten.

TABEL 4.

$\frac{1}{4}$ % glucose-serum met 3 vol. % dooier, tegenover serum zonder glucose met 3 vol % dooier.

39 positieve keelwatjes (op 66 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei- intensiteit	
	met glucose	zonder glucose	met glucose	zonder glucose	met glucose	zonder glucose	met glucose	zonder glucose
1×24 u.	30	30	2.8	2.9	2.5	2.2	1.3	1.—
2×24 u.	7	7	2.6	2.2	2.6	1.9	1.8	1.3
Samen	37	37						
Verhoudingscijfers bij de 39 positieve keelwatjes na 2 x 24 u			2.7 (2.5) ¹⁾	2.4 (2.2) ¹⁾	2.6	2.—	2.4	1.8

¹⁾ Zie de noot onder tabel 1.

Het totale aantal positieve uitkomsten is bij beide voedingsbodems gelijk. Ook is de gemiddelde kwaliteit der diagnose na 24 uur bij beide vrijwel dezelfde: met glucose 2.8, zonder glucose 2.9. De kwaliteit der poollichaampjes is echter bij het dooierserum zonder glucose minder dan bij hetzelfde met glucose: 2.2 tegen 2.5. De poollichaampjes waren n.l. op den glucose-vrijen (eigenlijk glucose-armen) voedingsbodem dikwijls onregelmatig van vorm en tot klompen met elkander versmolten. Dat niettemin aan de kwaliteit der diagnose bij het dooierserum zonder glucose na 24 uur een even hoog, zoo men wil zelfs een iets hooger cijfer dan bij denzelfden voedingsbodem met glucose toegekend moest worden, is daarin gelegen, dat de diphtheriebacillen op den glucose-vrijen bodem vaker in slanken vorm tot ontwikkeling kwamen.

Na 2×24 uur was echter de poollichaampjesvorming op de plaat zonder glucose beslist slechter dan op die met glucose: 2.- tegenover 2.6. In verband hiermede moest de kwaliteit der diagnose na 2×24 uur bij de suikervrije plaat ook lager beoordeeld worden; ze daalde van 2.9 na 24 uur tot 2.4 (2.2) na 2×24 uur. Bij het glucose-dooier-serum is de kwaliteit der diagnose daarentegen na 2×24 uur ongeveer op het peil van 24 uur gebleven: na 24 uur 2.8, na 2×24 uur 2.7 (2.5).

Uit deze resultaten werd het besluit getrokken, dat glucose in samenwerking met dooier-massa een gunstigen invloed op de vorming van mooie en typische poollichaampjes uitoefent, maar aan den lengte-groei niet bevorderlijk is. Het laatste hangt wellicht daarmede samen, dat glucose de groei-intensiteit van den voedingsbodem verhoogt (na 2×24 uur zijn de cijfers 2.4 en 1.8, tabel 4). Men kan zich voorstellen, dat op den glucose houdenden voedingsbodem de diphtheriebacillen zich sneller deelen en dus als het ware geen tijd hebben om tot den meer karakteristieken en voor de differentieel-diagnose tegenover pseudo-diphtheriebacillen gemakkelijker te gebruiken langen vorm uif te groeien.

Op grond van de genoemde overwegingen lag het voor de hand om de hoeveelheid glucose te gaan verminderen: het zou mogelijk kunnen zijn, dat met serum met 3 vol. % dooier, waaraan een hoeveelheid glucose, die minder dan $\frac{1}{4}\%$ bedraagt, toegevoegd was, een voedingsbodem verkregen werd, waarop de diphtheriebacillen zoowel veel en goed ontwikkelde poollichaampjes vormden, als de typische, slanke corynebacteriegedaante aannamen.

Om deze veronderstelling aan de werkelijkheid te toetsen, werden twee voedingsbodems met elkander vergeleken, n.l. 3% dooier-serum met $\frac{1}{4}\%$ glucose en 3% dooier-serum met $\frac{1}{8}\%$ glucose.

Er waren niet veel proeven noodig om vast te stellen, zoals uit tabel 5 blijkt, dat inderdaad door vermindering van het suikergehalte een betere voedingsbodem verkregen werd.

Het kleine getal der vergelijkende proefnemingen veroorlooft niet om uit het aantal positieve uitkomsten op beide voedingsbodems een conclusie te trekken. Alleen dient er op gewezen te worden, dat de glucose-arme voedingsbodem, wat dit aangaat, in elk geval niet de minste is. Maar duidelijk blijkt uit

TABEL 5.

3% dooier-serum met $\frac{1}{4}\%$ glucose, tegenover 3% dooier-serum met $\frac{1}{8}\%$ glucose.

16 positieve keelwatjes (op 35 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei- intensiteit	
	$\frac{1}{4}\%$ glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	$\frac{1}{4}\%$ glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	$\frac{1}{4}\%$ glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	$\frac{1}{4}\%$ glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose
1 × 24 u.	11	14	2.9 (2.3) ¹⁾	3.3	2.6	3.—	1.4	1.4
2 × 24 u.	3	2	2.5	2.3	2.5	2.3	1.7	1.5
Samen	14	16						
Verhoudingscijfers bij de 16 positieve keelwatjes na 2 x 24 u.			2.6 (2.3) ¹⁾	2.9 (2.7) ¹⁾	2.5	2.8	2.3	2.1

¹⁾ Zie de noot onder tabel 1.

tabel 5 — en hier kwam het bij deze proef op aan — dat zoo-
wel de gemiddelde kwaliteit van de diagnose als de gemiddelde
kwaliteit van de poollichaampjes bij den voedingsbodem met
 $\frac{1}{8}\%$ glucose gestegen zijn. Na 24 uur zijn de beoordeelings-
cijfers van de kwaliteit der diagnose 2.9 (2.3) tegen 3.3 en die
van de kwaliteit der poollichaampjes 2.6 tegen 3. Ook na 2 ×
24 uur blijven de uitkomsten bij den voedingsbodem met $\frac{1}{8}\%$
glucose eveneens beter dan bij dien met $\frac{1}{4}\%$ glucose: de be-
oordeelingscijfers der diagnose zijn dan 2.6 (2.3) tegen 2.9 (2.7)
en die der poollichaampjes 2.5 tegen 2.8.

De groei-intensiteit is op den voedingsbodem met $\frac{1}{8}\%$
glucose iets geringer dan op dien met $\frac{1}{4}\%$, namelijk: 2.1 tegen
2.3 na 2 × 24 uur.

Op het $\frac{1}{8}\%$ glucose-3 vol. % dooierserum (g.d.s.) ont-
wikkelen de diphtheriebacillen zich uit het keelslijm in het alge-
meen tot duidelijke, meestal slanke corynebacteriën, bijna steeds
alle voorzien van flinke, groote, doch niet overdreven groote,
regelmatige, ronde tot ovale poollichaampjes.

De microphoto's I en II mogen een indruk geven van de
preparaten, welke men zeer dikwijls verkrijgt. Het behoeft
echter wel nauwelijks opgemerkt te worden, dat nu en dan ook
korte vormen worden waargenomen en dat de poollichaampjes
soms ook wel eens klein zijn. Het komt feitelijk hierop neer,

dat de verkregen preparaten steeds goed en zeer dikwijls bijzonder mooi zijn.

De pseudodiphtheriebacillen groeien op het g.d.s. vrijwel steeds in den vorm van korte staafjes; de ontwikkeling van de poollichaampjes wordt bij hen door de toevoeging van dooier-massa niet merkbaar aangezet. Door de fraaie en overvloedige poollichaampjes en den slanken corynebacterievorm, welke de echte diphtheriebacillen in den regel vertoonen, aan de eene zijde, en door de gewoonlijk minder goed ontwikkelde poollichaampjes en den korten, weinig karakteristieken staafvorm der pseudodiphtheriebacillen aan de andere zijde, wordt het maken van een onderscheid tusschen beide bacteriesoorten aanzienlijk vergemakkelijkt. Sinds de g.d.s.plaat in het laboratorium van den dienst gebruikt wordt, komt het nog maar zelden voor, dat een preparaat slechts een twijfelachtig gestelde uitspraak toelaat.

Dat de toevoeging van de kleine hoeveelheid glucose inderdaad van beteekenis is, blijkt duidelijk uit tabel 6. Deze heeft wel geen nadere toelichting noodig.

TABEL 6.

3% dooier-serum met $\frac{1}{8}\%$ glucose, tegenover 3% dooier-serum zonder glucose.

9 positieve keelvatjes (op 16 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei-intensiteit	
	$\frac{1}{8}\%$ glucose	zonder glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	zonder glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	zonder glucose	$\frac{1}{8}\%$ glucose	zonder glucose
1×24 u.	8	7	3.5	2.4 (2.1) ¹⁾	2.9	2.1	1.2	0.8
2×24 u.	1	2	1.5	1.5	1.5	1.—	1.5	0.8
Samen	9	9						
Verhoudingscijfers bij de 9 positieve keelvatjes na 2 x 24 u.			3.1	1.8	2.6	1.6	2.—	1.6

¹⁾ Zie de noot onder tabel 1.

Bij de tot nu toe besproken onderzoeken werd begonnen met de vergelijking van Löffler-serum met $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum. Dit laatste bleek beter te zijn dan het eerste. Uit het goede $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum ontstond langs empirisch-constructieven

weg het betere $\frac{1}{8}\%$ glucose-3% dooierserum (g.d.s.). Om den kring te sluiten werd nu een vrij groote reeks onderzoekingen ingesteld, die beoogden om het g.d.s. met den voedingsbodem, waarvan oorspronkelijk uitgegaan was, dus met het Löffler-serum, te vergelijken.

De uitkomsten van deze laatste reeks vergelijkende onderzoekingen mogen wel eenigszins uitvoeriger toegelicht worden. Deze reeks vormt toch feitelijk den sluitsteen van de als een geheel opgevatte, gezamenlijke onderzoekingen. Bij de bespreking van de tabellen 7, 8 en 9 kan ik tegelijkertijd iets nader op enkele bijkomstigheden ingaan, hetgeen bovendien gewenscht is, omdat soortgelijke zich ook bij de andere vergelijkende proeven wel voorgedaan hebben.

TABEL 7.

Löffler-serum, tegenover $\frac{1}{8}\%$ glucose—3 vol. % dooier-serum (g.d.s.). (528 onderzochte keelwatjes).

Overzicht.

	Beoordeeling		Aantal positieve uitkomsten		Aantal positieve keelwatjes
	Löffler	g. d. s.	Löffler	g. d. s.	
Na 24 uur	+	+	115	115	115
	+	—	1	0	1
	—	+	0	19	19
			<u>116</u>	<u>134</u>	<u>135</u>
Na 24 uur } Löffler — } na 2×24 u. g. d. s. — }	+	+	25	25	25
	+	—	3	0	3
	—	+	0	18	18
			<u>28</u>	<u>43</u>	<u>46</u>
			144	177	Totaal <u>181</u>
Na 24 uur } Löffler + } na 2×24 u. g. d. s. — }	.	+	.	1	
Na 24 uur } Löffler — } na 2×24 u. g. d. s. + }	+	.	13	.	
			<u>Totaal 157</u>	<u>Totaal 178</u>	
Na 24 uur + Na 2×24 uur — }	Löffler, resp. g. d. s.		3	0	

Van de 528 onderzochte keelwatjes werden er in totaal 181 als positief vastgesteld. Van deze 181 positieve keelwatjes werden er slechts 157 door het Löffler-serum, daarentegen 178 door het glucose-dooier-serum ontdekt. Op 181 positieve uitkomsten heeft het Löffler-serum dus een totaal tekort van 24, dat is 13.3% en het g.d.s. een van 3, dat is slechts 1.7% opgeleverd. Op dit laatste tekort dient even dieper ingegaan te worden.

Ofschoon het g.d.s. beslist een betere voedingsbodem dan het Löffler-serum is, heeft het toch in 3 gevallen een negatief resultaat opgeleverd. In deze gevallen waren alleen op de bijbehorende Löffler-plaat, dus op den minder goeden voedingsbodem, diphtheriebacillen te vinden. Dat dit kan voorkomen behoeft bij eenig nadenken geenszins te verwonderen. In de eerste plaats is het mogelijk, dat op de 3 negatieve g.d.s.-platen heelemaal geen diphtheriebacillen gekomen zijn. In de tweede plaats moet naar voren gebracht worden, dat ook bij de vergelijkende onderzoeken de routine-techniek toegepast werd. Van elke plaat werden 2 preparaten gemaakt, gekleurd en onderzocht, alles op dezelfde wijze als bij de „gewone” diphtherieonderzoeken. Het is begrijpelijk, dat, ook al betracht men nog zoo groote zorgvuldigheid, het wel kan voorkomen, dat men bij het afnemen van materiaal van een plaat eens minder gelukkig is geweest. Ten slotte ontbreken antagonistische invloeden op het g.d.s. ook niet geheel en al.

Na 24 uur bedraagt de „oogst” van positieve keelwatjes, de eerste oogst dus, in totaal 135. Hiervan heeft het Löffler-serum er 116 en het g.d.s. er 134 geleverd. Het tekort, op 135 berekend, bedraagt dus bij het Löffler-serum 19, d.i. 14.1%, bij het g.d.s. 1, d.i. 0.7%. Na 24 uur is dus het g.d.s. duidelijk veel beter dan het Löffler-serum.

Op 157 positieve Löffler-serumplaten gebeurde het 3 maal, dat van een, na 24 uur positieve plaat na 2×24 uur geen positief preparaat meer verkregen werd. Uiteraard heeft deze waarneming voor de practijk geen beteekenis: een na 24 uur positieve plaat heeft haar plicht gedaan en wordt niet meer in de broedstoof gezet, maar gesteriliseerd. (Op de gevolgtrekking, dat een serumplaat steeds na 24 uur nagekeken moet worden, heb ik reeds op blz. 156 gewezen). Bij de vergelijkende onderzoeken was het evenwel de bedoeling, om ook antagonistische invloeden te bestudeeren en wel door aan deze tijd en

gelegenheid te geven om door te werken. Op deze wijze is het dan ook mogelijk geweest om aan te toonen, dat op het Löffler-serum antagonistische factoren niet alleen hun schadelijken invloed kunnen doen gelden, maar zelfs de overhand kunnen krijgen.

Bij de 178 positieve g.d.s.-platen is het geen enkele maal voorgekomen, dat een na 24 uur positieve plaat na 2×24 uur in een negatieve veranderd was. Antagonistische invloeden, hoewel deze ook hier niet geheel ontbreken, spelen dus bij het g.d.s. een zeer ondergeschikte rol. Het blijft niettemin ook bij dezen voedingsbodem gebiedende eisch om de plaat steeds na 24 uur na te kijken. Trouwens bij een andere proefneming werd éénmaal waargenomen, dat een aanvankelijk positieve plaat na 2×24 uur negatief was geworden. Zooiets is weliswaar een hooge uitzondering; het maant echter tot voorzichtigheid²⁰⁾.

De tabel 8 verschaft nog enkele nadere gegevens omtrent de percentages der positieve en negatieve uitkomsten.

TABEL 8.

Löffler-serum, tegenover $\frac{1}{2}\%$ glucose—3 vol. % dooier-serum (g.d.s.)
Percentages.

181 positieve keelwatjes (op 528 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten				Negatieve uitkomsten			
	Löffler serum		g. d. s.		Löffler serum		g. d. s.	
	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%
1×24 u.	116	64.1	134	74.—	65	35.9	47	26.—
Na 1 en 2×24 u. bijeengevord	157	86.7	178	98.3	24	13.3	3	1.7

Na 24 uur werden van de in totaal 181 positieve keelwatjes door het Löffler-serum 116, d.i., thans op de 181 berekend,

²⁰⁾ Het is natuurlijk mogelijk, zelfs wel waarschijnlijk, dat er, indien men van een aanvankelijk positieve plaat, welke door een langer verblijf in de broedstoof negatief geworden is, veel preparaten aangelegd had, wel diphtheriebacillen gevonden zouden zijn. Men moet echter bedenken, dat het van meet af bij de vergelijkende onderzoeken de bedoeling geweest is niet van de routine-practijk af te wijken.

64.1% aangewezen. Het g.d.s. ontdekte in denzelfden tijd van de 181 niet minder dan 134, d.i. 74%, dus bijna 10% meer. Het totale aantal positieve uitkomsten, dus de reeds na 24 uur positieve, vermeerderd met de eerst na 2×24 uur positieve uitkomsten, bedroeg bij het Löffler-serum 157, d.i. 86.7%, bij het g.d.s. 178, d.i. 98.3%, derhalve hierbij 11.6% meer.

Hetzelfde verschil tusschen Löffler-serum en g.d.s., wellicht nog iets sprekender, laat de rechterzijde van tabel 8 zien. Na 24 uur zijn er op het Löffler-serum van de 181 positieve keelwatjes nog 65, d.i. 35.9% negatief, bij het g.d.s. 47, d.i. 26%. In totaal heeft het Löffler-serum van de 181 positieve keelwatjes er 24, d.i. 13.3% niet onderkend. Dit aantal is bij het g.d.s. slechts 3, d.i. 1.7%, dus 11.6% minder.

Een verklaring voor de betere omstandigheden, welke het g.d.s. voor de ontwikkeling der in het keelslijm aanwezige diphtheriebacillen aanbiedt, geeft tabel 9.

TABEL 9.

Löffler-serum, tegenover ¼% glucose—3 vol. % dooier-serum (g.d.s.).

Beoordeelingscijfers.

181 positieve keelwatjes (op 528 onderzochte)								
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes		Gemidd. groei- intensiteit	
	Löffler- serum	g. d. s.	Löffler- serum	g. d. s.	Löffler- serum	g. d. s.	Löffler- serum	g. d. s.
1×24 u	116	134	2.5 (2.2) ¹⁾	3.2 (3.1) ¹⁾	2.7	3.1	1.7	1.—
2×24 u.	41	44	2.2	2.8	2.6	2.9	2.5	1.6
Samen	157	178						
Verhoudingscijfers bij de 181 positieve keelwatjes na 2 x 24 u.			2.4 (2.1) ¹⁾	2.9 (2.9) ¹⁾	2.6	3.1	2.7	2.—

¹⁾ Zie de noot onder tabel 1.

De gemiddelde groei-insentiteit is bij het Löffler-serum belist grooter dan bij het g.d.s. De cijfers zijn: na 24 uur 1.7 tegen 1.—; na 2×24 uur 2.5 tegen 1.6, resp. 2.7 tegen 2.—. Hierdoor wordt het begrijpelijk, dat antagonistische invloeden gemakke-

lijker op den Löffler-voedingsbodem dan op het g.d.s. tot uiting komen ²¹⁾).

De gemiddelde kwaliteit der poollichaampjes is bij het g.d.s. merkbaar beter dan bij het Löffler-serum: na 24 uur 3.1 tegen 2.7; na 2×24 uur 2.9 tegen 2.6, resp. 3.1 tegen 2.6. Grooter is nog het verschil ten gunste van het g.d.s. ten aanzien van de gemiddelde kwaliteit der diagnose: na 24 uur 3.2 (3.1) tegen 2.5 (2.2); na 2×24 uur 2.8 tegen 2.2, resp. 2.9 tegen 2.4 (2.1). Want niet alleen vertoonen de diphtheriebacillen op het g.d.s. in het algemeen meer en mooiere poollichaampjes dan op het Löffler-serum, ze ontwikkelen zich op het g.d.s. in den regel bovendien beter dan op het Löffler-serum tot slanke, typische corynebacteriën, met meer of minder duidelijke kolven.

Het spreekt van zelf, dat hoe markanter de diphtheriebacillen in het preparaat hun typische kenmerken laten zien, des te gemakkelijker en nauwkeuriger de diagnose gesteld kan worden. Dit is uiteraard voor de routine-practijk niet van betekenis ontbloot.

Het onderscheid tusschen het Löffler-serum en het g.d.s. kan, als wij ons van een ietwat gedurfd figuurlijke taal bedienen, als volgt uitgedrukt worden. Ten gevolge van de hooge voedingswaarde en het groote vochtgehalte ontwikkelt zich op het Löffler-serum een dichte, een „tropische” bacterieflora, te midden waarvan de diphtheriebacil wel goed gedijen, maar ook verstikken kan. Op het g.d.s. ontwikkelt zich, als gevolg van zijn goede voedingswaarde en geschikte samen-

²¹⁾ In het algemeen groeien verschillende bacteriën op Löffler-serum rijker dan op g.d.s. Als men strepen van reine culturen gelijktijdig op platen met Löffler-serum en met g.d.s. aanlegt, kan men dit goed waarnemen.

De diphtheriebacil ontwikkelt zich op g.d.s. goed; de streep is echter minder dik en vooral minder vochtig dan op Löffler-serum. Streptococcen en pneumococcen groeien op g.d.s. matig; de laatste somtijds heelemaal niet. Staphylococcen (albus en aureus), Sarcina, Tetrageus groeien op g.d.s. goed, doch minder intensief dan op Löffler-serum. B. proteus ontwikkelt zich op g.d.s. minder krachtig dan op Löffler-serum, hij zwemt op g.d.s. ook iets minder en de vervloeiing is minder uitgebreid. Hetzelfde geldt c.p. ook voor B. pyocyaneus en sporendragende bacillen (B. megatherium, B. subtilis). Gistcellen gedijen op de g.d.s.-plaat minder goed dan op de Löffler-serumplaat.

Dat de bacterie-beslagen op de Löffler-serumplaat dikker zijn dan op de g.d.s.-plaat, is wel voor een deel het directe gevolg daarvan, dat het Löffler-serum veel meer water bevat.

stelling, gepaard aan een matig vochtgehalte, een krachtige, doch minder dichte, een meer geordende bacterieflora, waarbinnen meer evenwichtige toestanden heerschen, zooals bij de planten in de gematigde luchtstreken; de diphtheriebacil groeit niet alleen op typische wijze, maar kan zich ook te midden van de andere bacteriën handhaven.

Hetgeen omtrent het $\frac{1}{8}\%$ glucose -3 vol. % dooierserum (g.d.s.) medegedeeld werd, kan aldus samengevat worden.

Het g.d.s. is voor de opsporing van diphtheriebacillen in keelslijm e.d. beter geschikt dan het Löffler-serum en wel op de volgende gronden:

a. *Het aantal positieve uitkomsten is beslist grooter.*

Na 24 uur is het aantal verkregen positieve uitkomsten ongeveer 10—14% grooter (10% als men dit percentage van het totale aantal positieve keelwatjes berekent; 14% indien men dit doet van het aantal der na 24 uur bekende positieve keelwatjes).

Het totale aantal positieve uitkomsten, d.w.z. de reeds na 24 uur verkregen uitkomsten, vermeerderd met die, welke eerst na 2×24 uur positief waren, is meer dan 10% grooter.

b. *De diphtheriebacillen ontwikkelen zich in het algemeen in een beteren en meer typischen vorm.* Practisch vertoonen alle diphtheriebacillen poollichaampjes; deze zijn in den regel groot, regelmatig, rond of ovaal. Bijna steeds nemen de diphtheriebacillen den kenmerkenden vorm van een slanke corynebacterie aan.

c. *De pseudodiphtheriebacillen blijven meestal kort en vormen niet meer poollichaampjes dan op het Löffler-serum.*

Ik kan dus het gebruik van het g.d.s. in plaats van het Löffler-serum voor de bacteriologische diagnose van de diphtherie en voor het opsporen van bacillendragers aanbevelen.

Hieraan moge nog toegevoegd worden, dat het g.d.s. zich ook goed voor de voortkweeking van reine culturen van den diphtheriebacil leent. De diphtheriebacillen blijven er lang levend op (bij kamertemperatuur bewaard langer dan een maand) en ontaarden niet merkbaar. In het bijzonder blijft het vermogen om poollichaampjes te vormen vrijwel onaangetast bestaan.

Hoewel de beschreven onderzoeken zich in wezen alleen bezigielden met een aangelegenheid van technisch-bacterio-

logischen aard en het g.d.s. langs empirisch-constructieven weg uit het Löffler-serum ontstaan is, zoo is het toch mogelijk, en daarom wenschelijk, om behalve aan de practische ook aan de meer zuiver wetenschappelijke zijde van de verrichte onderzoekingen aandacht te schenken. Dat de toevoeging van glucose en van eidooier de vorming van poollichaampjes in de hand kan werken, ondervindt namelijk den steun van verschillende gegevens in de literatuur.

In 1902 toonde *Grimme*²²⁾ aan, dat de „Volutanskugeln”, welke hij bij *Spirillum volutans*, *B. alvei* en bij den diphtheriebacil bestudeerde, bestonden uit een „eiwitachtig lichaam”, dit, zooals hij zich uitdrukte, in den uitgebreidsten zin opgevat. Inderdaad schijnt de toevoeging „im weitesten Sinne” niet geheel overbodig, als men uit zijn publicatie verneemt, dat de volutans-bollen feitelijk geen enkele typische eiwitreactie gaven.

*Arthur Meyer*²³⁾, de leermeester van *Grimme*, vond de substantie, waaruit de „Volutanskugeln” bestonden, en aan welke stof hij den naam volutine gaf, bij vele lagere plantensoorten, en in buitengewoon groote hoeveelheden bij fungi. *Meyer* verrichtte zijn onderzoekingen speciaal met Ascomyceten, Saccharomyceten en Schizomyceten. Op grond van zijn onderzoekingen stelde *Meyer* een hypothese op, volgens welke het volutine een nucleïnezuur-verbinding zijn zou, want dezelfde reactie's, waarmede hij het volutine in de cel kon aantoonen, verkreeg hij ook, als hij met het zuivere, uit gist bereide nucleïnezuur reageerde. Daar echter niet alle reacties volledig overeenstemden, nam hij aan, dat het nucleïnezuur binnen de cellen aan de een of andere stof gebonden was.

In 1917 volgt nu een fraai onderzoek van wijlen *Mej. Van Herwerden*²⁴⁾. Zij werkte met *Ustilago maydis*, *Torula monosa* en een „lactose-gist” en stelde door nauwkeurige proeven onder meer het volgende vast.

1. De vorming van het volutine in myceten is aan de tegenwoordigheid van een organische of anorganische phosphorverbinding gebonden.

2. Met verdunde alkaliën wordt aan volutine bevattende microorganismen, tegelijk met het volutine, een nucleïnezuur-

²²⁾ Z. f. B. O. 1902, Bd 32, blz. 246.

²³⁾ Botanische Zeitung, 1904. Bd 62, blz. 113.

²⁴⁾ Folia microbiologica, Ned. Tijdschr. v. Microbiologie 1917.

verbinding onttrokken. Men verkrijgt in het extract een hoeveelheid nucleïnezuur, welke veel grooter is dan die, welke op dezelfde wijze uit een volutine-„vrije” cultuur getrokken wordt.

3. Het volutine is een nucleïnezuur-verbinding.

Door *Van Herwerden* werd dus de hypothese van *Meyer* tot een feit verheven. Toch moet hierbij opgemerkt worden, dat *Van Herwerden*, evenmin als *Meyer*, met zekerheid aangetoond heeft, dat het volutine een nucleïnezuur-verbinding is.

Schumacher ²⁵⁾ heeft het in 1922 in hooge mate waarschijnlijk gemaakt, dat de substantie, waaruit de poollichaampjes van den diphtheriebacil en het volutine der gistcellen opgebouwd zijn, vrij nucleïnezuur is. Door toepassing van de methyleenblauw-phosphine-methode vond hij, dat de poollichaampjes en het gistcellen-volutine zich groen kleurden, wat op vrij nucleïnezuur wijst. Nucleïne en nucleoproteïden nemen onder gelijke omstandigheden een gele kleur aan. Kleurmethoden, welke door *Schumacher* speciaal op het aantoonen van nucleïnezuur ingesteld waren, leverden resultaten op, die geheel met de veronderstelling, dat volutine uit vrij nucleïnezuur bestaat, in overeenstemming waren.

Pesch ²⁶⁾ heeft aangetoond, dat de toevoeging van phosphaten of van nucleïnezuur de vorming van poollichaampjes versterkt. Door talrijke systematische onderzoekingen heeft voorts *Lorentz* ²⁷⁾ o.a. vastgesteld, dat diphtheriebacillen voor goeden groei veel eiwit noodig hebben en dat de ontwikkeling der poollichaampjes o.a. door glycerine, glucose, lecithine en natrium oleicum duidelijk bevorderd wordt.

Hoewel langs empirisch-constructieven weg verkregen, heeft het g.d.s. toch een samenstelling, die wetenschappelijk behoorlijk gefundeerd is. Het bevat uiteraard veel eiwit en daarbij glucose en phosphorhoudende stoffen en wel van beide in hoeveelheden, die experimenteel bepaald en geschikt gevonden werden.

Dat glucose de vorming van poollichaampjes aanzet, zooals ook door *Lorentz* aangetoond is, staat vast. Uit de tabellen 4 en 6 blijkt het duidelijk. Slechts in schijn is deze waarneming in tegenspraak met de bevindingen van *Van Herwerden*, volgens

²⁵⁾ Z. f. B. O. 1922. Bd 88, blz. 362.

²⁶⁾ Z. f. B. O. 1924. Bd 92, blz. 208.

²⁷⁾ Z. f. B. O. 1924. Bd 92, blz. 331.

welke chemisch zuivere glucose op de vorming van volutine absoluut geen invloed uitoefent. De tegenstelling is echter mijns inziens slechts schijnbaar, omdat *Van Herwerden* glucose toevoegde aan voedingsbodems, die geen, of liever zeer weinig fosphaten bevatten. Op zulk een voedingsbodem kan glucose onmogelijk de vorming en vermeerdering van nucleïnezuur bevorderen, daar immers een van de belangrijkste bouwstenen van het nucleïnezuur, n.l. phosphorzuur, er in ontbreekt. *Van Herwerden* kreeg dan ook door van phosphorarme voedingsbodems gebruik te maken haar volutine-vrije culturen. Dat evenwel glucose, toegevoegd aan voedingsbodems, welke phosphaat bevatten, de vorming en vermeerdering van nucleïnezuur begunstigt, heeft niets verwonderlijks. Glucose oefent toch bij vele bacteriën en hogere schimmels een stimuleerenden invloed op de levensprocessen uit. Op dezelfde wijze kan wellicht ook verklaard worden, dat glycerine de vorming van poollichaampjes bevordert.

Door de toevoëging van dooiermassa verkrijgt het g.d.s. de noodige hoeveelheden phosphor, en klaarblijkelijk in den gunstigen vorm van lecithine en vitelline. De eerste stof is opgebouwd uit 3 groepen, welke gunstig op de vorming en vermeerdering van nucleïnezuur kunnen werken. Zij bevat, zooals men weet, een phosphor-, een glycerine- en een vetzuurcomponent. Het vitelline is volgens *Bayliss* en *Plimmer* ²⁸⁾ een phosphoproteïne, waarvan volgens *Kay* ²⁸⁾ cystine een der bouwstenen is. In vitelline zijn zeker twee componenten aanwezig, die de vorming van poollichaampjes in de hand kunnen werken: behalve phosphor ook cystine, van welke laatste stof *Lorentz* ²⁹⁾ aangetoond heeft, dat zij de ontwikkeling van poollichaampjes aanwakkert.

Het behoeft wel nauwelijks gezegd te worden, dat het feit, dat lecithine en vitelline als bouwstenen van hun moleculen stoffen bevatten, welke op de vorming van poollichaampjes gunstig werken, niet voldoende is om den experimenteel vastgestelden, stimuleerenden invloed, die van de dooiermassa op den aanmaak van poollichaampjes uitgaat, geheel te verklaren. Daarvoor zou het noodzakelijk zijn om te weten, op welke wijze de diphtheriebacillen en andere lagere planten de gecompli-

²⁸⁾ Geciteerd naar Needham, *Chemical Embryology*, 1931. Vol. I.

²⁹⁾ *Z. f. B. O.* 1931. Bd 120, blz. 331.

ceerde, en wat haar samenstelling betreft bovendien nog niet volledig bekende stof, het nucleïnezuur, opbouwen. Zoover zijn we nog op lange na niet. Maar het maakt toch eenigermate begrijpelijk, dat het g.d.s. den diphtheriebacil voor de ontwikkeling van zijn poollichaampjes goede voorwaarden aanbiedt. Het bevat de daarvoor noodige stoffen, klaarblijkelijk niet slechts in een goed assimileerbaren vorm, maar ook — en dit wil ik nogmaals naar voren brengen — in geschikte hoeveelheden. Want duidelijk is gebleken, dat zoowel een te veel als een te weinig aan glucose en dooiersubstantie de productie van poollichaampjes remt.

De bereiding van het g.d.s. is zeer eenvoudig. Het heeft mij dikwijls bevreemd, dat men het Löffler-serum een duren voedingsbodem vindt en dat men de bereiding ervan omslachtig noemt. Voor mij behoort het tot de eenvoudige en goedkoopere voedingsbodems, want serum kan men toch gemakkelijk tegen een kleine vergoeding van een slachthuis betrekken en de stolling is toch een eenvoudige en weinig dure bewerking. Het schijnt mij toe, dat, op grond van voorschriften uit vroegeren tijd, wellicht nog te veel moeite en tijd aan de gefractioneerde sterilisatie van het serum besteed wordt. Daarom acht ik het wenschelijk eenigszins uitvoerig op de bereiding van het

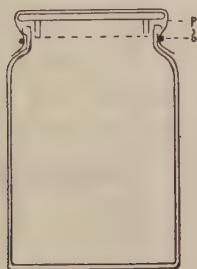


Fig. 3. Haringflesch.

Het deksel is iets van den rand van de flesch verwijderd geteekend.

p = perkamentpapier.

b = bindtouw.

g.d.s., welke op analoge wijze, als die van het Löffler-serum geschiedt, in te gaan, waarbij ik dan tevens de gelegenheid heb om een stollingstoestel te beschrijven, dat, wat zijn constructie betreft, afwijkt van de gewoonlijk gebruikte stollingsapparaten.

1. De winning van het serum. In het slachthuis wordt het bloed, terwijl het rund verbloed wordt, in „haringflesschen” met een inhoud van 2—3 L. opgevangen. De haringflesch heeft het voordeel, dat het deksel niet vast kan gaan zitten. Ook

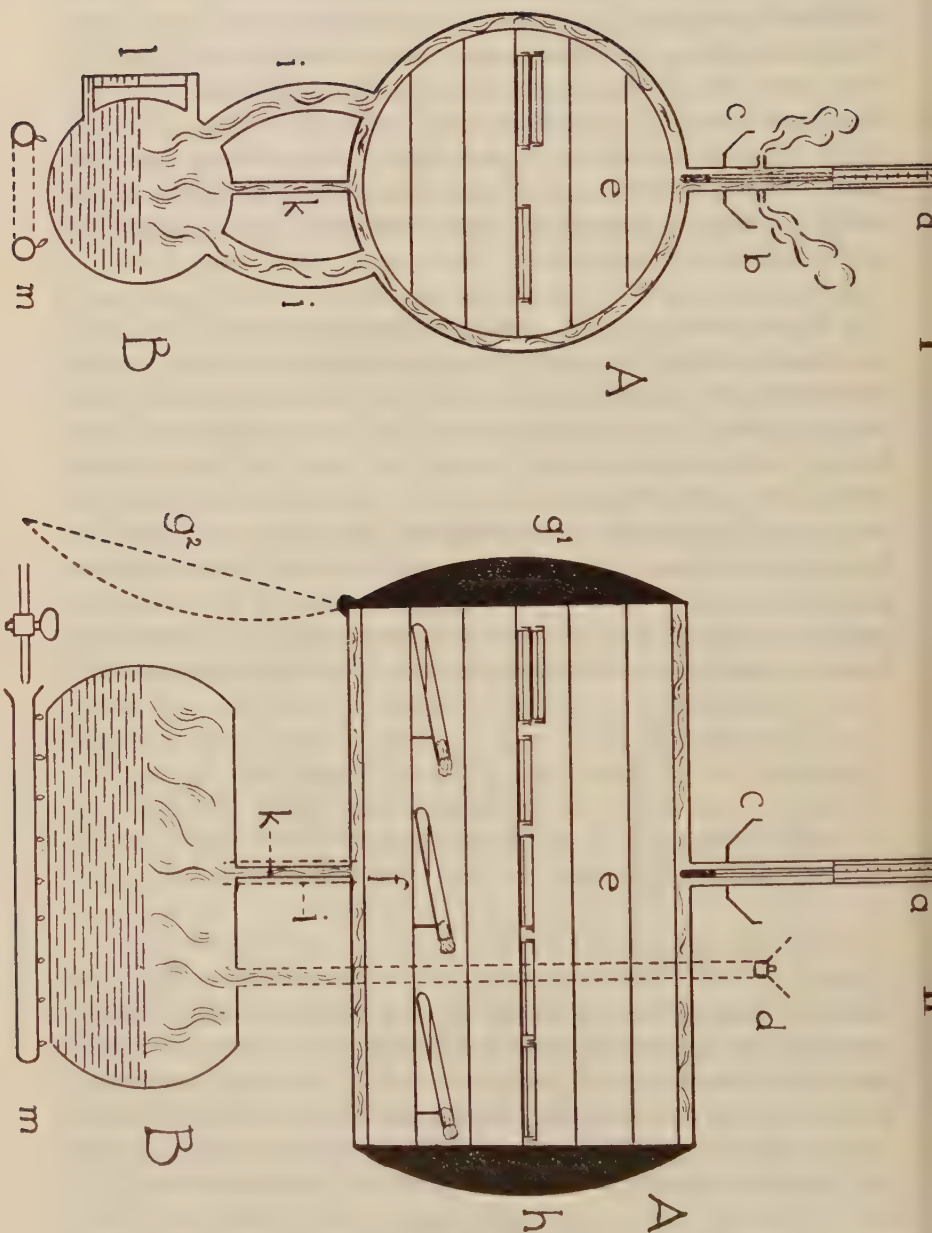


Fig. 4. Stollingstestel.

Toelichting bij fig. 4.

- I Schematische dwarse doorsnede.
 - II Schematische lengte-doorsnede.
In I en II beteekenen de letters het volgende:
 - A Stollingsruimte.
 - B Stoomketeltje.
 - a Thermometer.
 - b Openingen, waaruit de stoom ontsnapt.
 - c Schaal voor het opvangen van druppels condensie-water.
 - d Buis met trechtervormige verwijding en afgesloten door een schroefdoop.
Deze buis dient om het water in B bij te vullen.
 - e Raam voor Petri-schalen.
 - f Raam met verhoogingen, voor cultuurbuisjes.
 - g¹ Deur, gesloten.
 - g² Deur, geopend.
 - h Achterkant.
 - i Buis, welke den stoom voor A aanvoert.
 - k Buisje, waarlangs het condensie-water na beëindiging van de stolling naar B terugloopt.
 - l Peilglas.
 - m U-vormige gasbrander.
- Het toestel is van koper. De ramen zijn van koperen banden vervaardigd. De binnenzijde van het toestel en de ramen zijn vertind. Deur en achterkant zijn met asbestwol opgevuld. A is aan den buitenkant met linoleum bekleed.
- Maten. A. Inwendige dwarse doorsnede 32 cm.
 Uitwendige dwarse doorsnede 37 cm.
 Inwendige lengte-doorsnede 48 cm.
- B. Dwarse doorsnede 19 cm.
 Lengte-doorsnede 36 cm.

Weckflesschen zouden gebruikt kunnen worden. Over het deksel wordt, voordat de flesch gesteriliseerd wordt, een stuk perkamentpapier aangebracht (zie fig. 3). Het deksel wordt tegelijk met het papier van de flesch genomen en na de vulling er met het papier weer opgebracht. Nadat het bloed gecoaguleerd is, wordt de bloedkoek door snel ronddraaien van den wand los gemaakt. Hierna blijven de flesschen gedurende 2 tot 3 dagen in het koellokaal staan. Het serum wordt vervolgens in een steriele flesch overgegoten of overgepipetteerd en in de koelkast van het laboratorium bij ongeveer 0° bewaard. Het serum is en blijft op deze wijze practisch steriel.

2. De menging. Aan bijv. 970 cc serum, dat zich in een kolf bevindt, wordt 30 cc dooiermassa toegevoegd. Daarvoor zijn 2 tot 3 eieren noodig. De schalen worden met alcohol gereinigd. Op de bekende wijze worden de dooiers van het eiwit gescheiden. De dooiermassa wordt in een steriel maatglas afgemeten en in een steriel mortier met een weinig serum tot een gelijkmatige massa verwreven. Toegevoegd wordt 1.250 Gr. glucose, opgelost in 5 cc steriel aqua dest., en zorgvuldig met de dooiermassa vermengd. De aldus ontstane vrij dunne, zalfachtige substantie wordt nu door een stukje steriel gaas of een vliesje steriele watten gefiltreerd, ten einde enkele grove deelen tegen te houden, en ten slotte onder omschudden met het overige serum gemengd. De dooiermassa vermengt zich zeer gemakkelijk met het serum.

De beschreven menging heeft zeker iets meer om het lijf dan de menging van serum en glucose-bouillon. Men moet echter niet uit het oog verliezen, dat de bereiding van glucose-bouillon op zichzelf ook tijd en moeite kost.

3. De stolling. Het bekende, doosvormige, platte, met water gevulde stollingstoestel, aan zijn bovenkant met een glazen deksel en met vilt of linoleum afgesloten, welk toestel wel in de meeste bacteriologische laboratoria gebruikt zal worden, heeft gebreken: het werkt weinig economisch en de warmteverdeeling is niet gelijkmatig. Sinds jaren wordt in het laboratorium van den gezondheidsdienst van het in fig. 4 schematisch weergegeven toestel gebruik gemaakt. De eenvoudige inrichting zal na lezing van de naast de figuur afgedrukte toelichting wel voldoende voor zichzelf spreken. De Petri-schalen en de cultuurbuisjes worden op in- en uitschuifbare, van koperen

banden gemaakte ramen in de cilindervormige ruimte gebracht³⁰⁾. De verhitting der platen geschiedt door stroomenden waterdamp. Deze wordt in een kleinen ketel opgewekt. Als water gebruikt men het best aqua dest., natuurlijk ter vermindering van aanzetting van ketelsteen. Het waterverbruik is zoo klein, dat men op de kosten daarvan niet behoeft te letten.

Wanneer de stollingsruimte gevuld is, wordt de gasbrander aangestoken. Men laat de gasvlammen hoog branden tot de stoom krachtig uit de openingen bij b begint te blazen. Dit geschiedt na ongeveer 15 min. De thermometer wijst dan de gewenschte temperatuur van ongeveer 100° C aan. De gasvlammen worden nu laag gezet. Er moet evenwel goed zorg voor gedragen worden, dat de stoom wel rustig, maar ook voortdurend blijft stroomen, opdat de temperatuur van 100° gehandhaafd blijft. Na eenige ervaring weet degene, die met het toestel omgaat, precies, welken stand de gaskraan moet hebben. Als de stoom kalm en regelmatig naar buiten komt, kan het toestel zonder eenig toezicht blijven werken. Bij een matige vulling (45—50 Petri-schalen en een 20-tal buisjes) is de stolling 2 uur, nadat de gasvlammen klein gezet werden, afgelopen; bij een maximale vulling (80 platen of 120 buizen) bedraagt de stollingsduur 2½ uur. Het gas wordt na afloop van de stolling uitgedraaid en de deur geopend. De schalen en buisjes worden nog warm uit het toestel genomen. De Petri-schalen komen, met het deksel naar beneden, dadelijk in schalenstandaards. Op deze wijze ontwikkelt zich weinig condensiewater en heeft dit ook geen gelegenheid om op den voedingsbodem te vallen. Na afkoeling worden de Petri-schalen in de koelkast geplaatst; de buisjes (bestemd voor het voortkweken van reine culturen) worden, na contrôle in de broedstoof, bij kamertemperatuur bewaard.

De op de beschreven wijze bereide voedingsbodem is bijna steeds volledig steriel. Een zeer enkele kolonie, die de serumplaat eventueel mocht infecteeren, is natuurlijk van geen betekenis, en door de broedstoof-contrôle en het bewaren bij kamertemperatuur komt een eventuele infectie van het serum in een buisje aan het licht. Slechts zelden moet een buisje wegens infectie weggedaan worden.

³⁰⁾ Het toestel kan natuurlijk ook rechthoekig geconstrueerd worden.

De binnen de stollingsruimte langzaam bereikte, hoogste temperatuur beweegt zich tusschen 80 en 85° C. *Ook voor de stolling van andere voedingsbodems, zooals bijv. die van Löwenstein, bewijst het toestel zeer goede diensten.*

III. Fixatie en kleuring der preparaten.

Het is eigenlijk eenigszins merkwaardig, dat sinds *Koch* het driemaal door de vlam halen invoerde (naar het voorbeeld van *Ehrlich*, die gevonden had, dat verhitting in een op 120—130° verwarmde droogoven een doelmatige fixatiemethode was, in het bijzonder voor bloedpreparaten), iedere bacterioloog getrouwelijk, jaar in, jaar uit, hetzelfde gedaan heeft. Toch is, zooals mij de laatste jaren meer en meer gebleken is, de methode te verbeteren en te vereenvoudigen.

Dikwijls heb ik bij preparaten, welke ik van diphtherieplaten aanlegde, en waarbij voor het uitstrijken op het voorwerpglasje, der gewoonte getrouw natuurlijk water werd gebruikt, de ervaring opgedaan, dat door samenkleving de bacteriën, vooral in het Neisser-preparaat, herhaaldelijk niet of nauwelijks als afzonderlijke staafjes of coccen te onderkennen waren. Ik heb aan het water de schuld hiervan gegeven en de druppel water door een druppel formaline-oplossing vervangen, n.l. door het 10 maal verdunde formaline van den handel. In plaats van water werd dus de voor fixatie van weefselstukjes meest gebruikte fixeervloeistof aangewend. Het resultaat was zeer bevredigend. De bacteriën blijven evengoed als bij flambeering aan het voorwerpglasje kleven. Door vergelijking bleek verder, dat een, in een druppel formaline-oplossing uitgestreken, niet door de vlam gehaald preparaat van een diphtherieplaat, nu eens wat meer, dan weer wat minder, doch steeds beter is dan een op de oude methode geflambeerd waterpreparaat. De bacteriën zijn duidelijker als individuen afgeteekend. Daarom heb ik dezelfde „methode” ook bij andere bacteriesoorten beproefd, steeds met goed gevolg. Door de fixatie met formaline behouden de bacteriën haar vorm; ze zijn iets grooter en bijzonderheden treden scherper naar voren, dan wanneer ze met water uitgestreken en driemaal door de vlam gehaald zijn. Gemakkelijk en zeer sprekend kan dit laatste met behulp van een bipolair staafje aangetoond worden. Meermalen heb ik waargenomen, dat door toepassing der „watermethode” van een

cultuur, bestaande uit bipolaire staafjes, een preparaat verkregen werd, waarin de staafjes hun bipolariteit niet, of slechts flauw aangeduid, vertoonden, terwijl het formaline-preparaat, van precies dezelfde cultuur gemaakt, uitsluitend mooie bipolaire staafjes liet zien. De microphoto's III en IV mogen hieromtrent een indruk geven. Daarom heb ik de „formalinemethode” voor alle bacteriepreparaten in het laboratorium van den dienst ingevoerd.

De formalinemethode, die dus als een algemeene fixatiemethode voor bacteriepreparaten opgevat kan worden, heeft naast de fixatie in beteren vorm nog enkele andere voordeelen.

Samengevat zijn de voordeelen, welke zij boven de watermethode aanbiedt, de volgende:

a. De bacteriën behouden beter haar vorm.

b. Besparing op tijd en werk. Als veel preparaten vervaardigd moeten worden, beteekent het wegvallen van het 3 maal door de vlam halen een merkbare winst op tijd en werk.

c. De preparaten zijn als steriel te beschouwen. Het is bekend, dat de bacteriën in de op de gewone wijze gemaakte, nog ongekleurde preparaten niet dood zijn en dat zij door de kleuring met kleurstoffen, welke op zichzelf niet steriliseerend werken, of indien bij de kleuring geen stoffen gebruikt worden, die bacteriën aantasten, niet steeds gedood worden. Hier schuilt een gevaar, dat onder bepaalde omstandigheden groter kan zijn, dat men bevroedt (vliegen!). In eenige proeven heb ik kunnen vaststellen, dat staphylococcen, streptococcen, pneumococcen, diphtheriebacillen, typhusbacillen e.a. bacteriën door het uitstrijken en drogen in formaline-oplossing gedood worden. Zooals te verwachten was blijven sporen (onderzocht werden miltvuursporen) in het leven, alhoewel een gedeelte van het uitgestreken materiaal toch gedood blijkt te zijn.

d. De in formaline-oplossing uitgestreken bacteriën nemen kleurstoffen evengoed aan als de in water verdeelde. De kleurstoffen worden ook weer goed afgegeven. Gram-negatieve bacteriën blijven Gram-negatief en Gram-positieve blijven positief. Merkwaardigerwijze is gebleken, dat sommige met formaline behandelde bacteriën, met name coccen en corynebacteriën, door vesuvine duidelijker donkerder, bruiner, gekleurd worden dan onder gelijke omstandigheden met water uitgestreken bacteriën.

Voor de kleuring van de, van een g.d.s.-plaat gemaakte preparaten pas ik steeds de Neisser-kleuring en de Gram-kleuring toe. De laatste brengt het corynebacterie-karakter van den diphtheriebacil wel het best aan het licht. De Löffler-kleuring kan m.i. bij de routine-onderzoekingen achterwege blijven.

In den loop der jaren hebben de beide eerstgenoemde kleuringsmethoden in het laboratorium van den dienst een vorm verkregen, welke iets van den in de meeste laboratoria gebruikten afwijkt.

Bij de Neisser-kleuring wordt voor het kleuren der poollichaampjes het gewone mengsel van azijnzuur-methyleenblauw en kristalviolet aangewend, dus de kleurstof van de „nieuwe” Neisser-kleuring gebruikt; voor de kleuring der bacteriëlijven is echter het vesuvine gehandhaafd. Het chrysoidine heeft het laboratoriumpersoneel en mij nimmer kunnen bevredigen. Vesuvine geeft m.i. betere en aangenamere contrastwerking. Bij de met formaline behandelde uitstrijkpreparaten kleurt het vesuvine bovendien zoo voldoende krachtig, dat men geen andere tegenkleurstof begeert.

De kleuring geschiedt aldus:

1. Preparaat in 10% formaline-oplossing uitstrijken, aan de lucht laten drogen, niet flambeeren.
2. $\frac{1}{2}$ —1 min. azijnzuur-methyleenblauw-kristalviolet.
3. Afspoelen.
4. 3—5 min. vesuvine (1 Gr. op 1000 cc aqua dest. fervida).
5. Afspoelen en drogen.

De langdurige inwerking van vesuvine bewerkstelligt niet alleen een donkerdere, maar ook een mooiere contrastkleuring, omdat, (zooals, naar men weet, reeds door *Koch* aangetoond is) vesuvine niet alleen kleurt, maar ook differentieert. De goed afgeteekende lijven der diphtheriebacillen en der overige bacteriën worden duidelijk bruin, waartegen de poollichaampjes flink uitkomen. Men behoeft niet te vreezen, dat de poollichaampjes door de langere nakleuring uitgeloozd kunnen worden, want ten eerste lost het volutine (dus nucleïnezuur of nucleïnezuur-verbinding) in water slechts langzaam op en ten tweede heeft *Grimme* (l.c.) aangetoond, dat het volutine onder den invloed van het formaldehyde minder oplosbaar wordt.

De kleuring volgens Gram wordt aldus uitgevoerd:

1. Preparaat in 10% formaline-oplossing uitstrijken, aan de lucht laten drogen, niet flambeeren.
2. 3 min. anilinewater-gentianaviolet ³¹⁾.
3. 3 min. Lugol-oplossing.
4. Ontkleuring in alcohol 96%.
5. Afspoelen en drogen, zonder tegenkleuring.

Het anilinewater-gentianaviolet schijnt mij toe betere en meer betrouwbare resultaten te geven dan het carbol-gentianaviolet. Tegenkleuring heeft voor de diphtheriepreparaten geen beteekenis: men zoekt toch alleen naar Gram-positieve bacteriën.

Dat de formaline-methode werkelijk betere preparaten levert, blijkt duidelijk uit tabel 10.

TABEL 10.

Watermethode, tegenover Formaline-methode.

64 positieve keelwatjes (op 169 onderzochte)						
Verblijf bij 37° gedurende	Positieve uitkomsten		Gemidd. kwaliteit der diagnose		Gemidd. kwaliteit der poollichaampjes	
	Water	Formaline	Water	Formaline	Water	Formaline
1 × 24 uur	46	46	2.7	3.4	2.7	2.9
2 × 24 uur	17	17	2.3	2.4	2.6	2.6
Samen	63	63				
Verhoudingscijfers bij de 64 positieve keelwatjes na 2 x 24 uur			2.5	2.9	2.7	2.9

Tegelijkertijd werden van dezelfde g.d.s.-plaat telkens 2

³¹⁾ De bereiding hiervan geschiedt aldus: 2 cc aniline-olie op 100 aqua dest., schudden. De aniline-olie lost bijna volledig op. Filtreeren door nat filtreerpapier. Het anilinewater wordt in een groote heelveelheid in voorraad gehouden en in het donker bij kamertemperatuur bewaard. Van een, liefst niet meer dan eenige dagen oude, verzadigde alcoholische oplossing (96%) van gentianaviolet, komt 4 cc op 100 cc anilinewater, dat even te voren nogmaals gefiltreerd is. Hierna worden 15 cc alcohol 96% toegevoegd. Kort verhitten tot de vloeistof even opkookt. (Dit dient om de vorming van neerslagen tegen te gaan). Vóór het gebruik filtreeren. Dit anilinewater-gentianaviolet blijft op zijn minst eenige weken bruikbaar.

preparaten vervaardigd. Het eene tweetal werd in water uitgestreken en driemaal door de vlam gehaald, het andere in 10% formaline-oplossing verdeeld en niet geflambeerd. Van elk tweetal werd één preparaat op de hierboven beschreven wijze volgens Neisser en één volgens Gram gekleurd.

De gemiddelde kwaliteit van de diagnose is bij de formaline-methode duidelijk beter: na 24 uur 3.4 tegen 2.7; na 2×24 uur 2.9 tegen 2.5. De gemiddelde kwaliteit der poollichaampjes is bij beide methoden ongeveer dezelfde, toch bij de formaline-methode eerder nog iets beter: 2.9 tegen 2.7. De oorzaak voor het verschil in waardeering van de kwaliteit der diagnose is vooral gelegen in de grootere duidelijkheid van het door formaline gefixeerde preparaat: de diphtheriebacillen zijn goed afgeteekend, iets breeder dan in het waterpreparaat, de poollichaampjes komen scherp uit, de corynebacterie-vorm komt volledig tot zijn recht. Nu en dan krijgt men den indruk, dat de poollichaampjes bij de water-methode iets grooter zijn. Veel heeft dit niet te beteekenen. Het kan ook wel inbeelding zijn, tengevolge van het feit, dat bij de water-methode de bacterielijven smaller zijn. Ook is het denkbaar, dat het volutine in water iets opzwelt.

Bij de negatieve platen verschaft de formaline-fixatie eveneens beter geteekende, dus aangenamer en gemakkelijker door te zoeken preparaten dan de watermethode.

Alles bijeen genomen schijnt mij de formaline-methode een kleine, doch niet te veronachtzamen verbetering van de techniek der bacteriologische diagnose der diphtherie te zijn.

Samenvatting.

Naar aanleiding van de in den laatsten tijd, vooral in de Deutsche literatuur, verschenen publicaties over de vorming van poollichaampjes in diphtheriebacillen, en over nieuwe diphtherievoedingsbodems, wordt medegedeeld, welke veranderingen de techniek van de bacteriologische diagnose der diphtherie in den loop der jaren in het door den schrijver geleide laboratorium ondergaan heeft, en wel omdat de kleinere en grootere veranderingen tezamen genomen de techniek verbeterd hebben.

In de eerste plaats wordt een eenvoudige wijziging, welke aan het gewone keelvatje aangebracht werd, beschreven. Door

de verandering wordt de indroging van het slijm aan het keelwatie tegengegaan.

In de tweede plaats wordt een voedingsbodem beschreven, die langs empirisch-constructieven weg uit het Löffler-serum ontstaan is. Gedurende verscheidene jaren werd met succes in plaats van het Löffler-serum $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum gebruikt. Deze voedingsbodem is electiever dan het Löffler-serum. De diphtheriebacillen ontwikkelen zich er goed en in goeden vorm op.

Uit het goede $\frac{1}{4}\%$ glucose-serum werd geleidelijk het betere $\frac{1}{8}\%$ glucose-3 vol. % dooierserum opgebouwd. Op dezen voedingsbodem (g.d.s.) groeien de diphtheriebacillen meestal tot lange corynebacteriën uit, terwijl ze tevens talrijke en flinke poollichaampjes vormen. De antagonistische werking van de andere, in keelslijm aanwezige bacteriën is op het g.d.s. veel geringer dan op het Löffler-serum.

Door een vergelijkend onderzoek werd het volgende vastgesteld: Na 24 uur is bij het g.d.s. het aantal positieve uitkomsten ongeveer 10 tot 14% grooter dan bij het Löffler-serum. Het totale aantal positieve uitkomsten, d.w.z. de reeds na 24 uur verkregen positieve uitkomsten, vermeerderd met die, welke eerst na 2×24 uur positief waren, is bij het g.d.s. ruim 10% grooter dan bij het Löffler-serum. De diphtheriebacillen ontwikkelen zich bovendien op betere wijze (langer; meer en grootere poollichaampjes). Daardoor wordt ook de differentiatie tegen pseudodiphtheriebacillen vergemakkelijkt.

Aangetoond wordt, dat de empirisch gevonden samenstelling van het g.d.s. op grond van gegevens in de literatuur wetenschappelijk goed verantwoord is.

De bereiding van het g.d.s. wordt beschreven, en in verband daarmee een nieuwe, betere constructie voor een stollingstoestel aangegeven. Dit toestel is ook zeer geschikt voor de stolling van de eier-voedingsbodems, bestemd voor het kweken van tuberkelbacillen.

In de derde plaats wordt de fixatie en kleuring der van de platen aangelegde preparaten behandeld. In plaats van water wordt een 10% formaline-oplossing voor het maken der uitstrijkpreparaten aanbevolen. De preparaten zijn dan beter gefixeerd en behoeven niet meer driemaal door de vlam gehaald te worden.

De formaline-methode kan als een algemeene fixatiemethode voor bacterie-uitstrijkpreparaten aanbevolen worden. De voordeelen van de methode zijn: de bacteriën behouden beter haar vorm; het wegvallen van de flambeering beteekent besparing van werk en tijd; de preparaten zijn, behalve bij sporenvormende bacteriën, steriel.

Voor de diphtheriediagnose heeft de formaline-methode bovendien nog het voordeel, dat de preparaten goed geteekend zijn en de bacteriën door vesuvine krachtig bruin gekleurd worden. In verband hiermede wordt nog even vermeld op welke wijze de Neisser-kleuring en de Gram-kleuring uitgevoerd worden.

Toelichting bij de microphoto's.

Microphoto I. Vergrooting 2000 \times ³²⁾.

Diphtheriebacillen uit het keelslijm van een patiënt. Gekweekt op g.d.s. Na 24 uur.

Kleuring: Azijnzuur-methyleenblauw-kristalviolet volgens Neisser 1 min. Vesuvine 5 min.

Watermethode.

Voor de microphoto werd het waterpreparaat gekozen, omdat *op de photo* het contrast tusschen de heldergele bacterielichamen en de poollichaampjes beter uitkomt dan tusschen de meer bruine bacterielichamen en de poollichaampjes van het formaline-preparaat.

Microphoto II. Vergrooting 2000 \times .

Diphtheriebacillen uit het keelslijm van een patiënt (een anderen dan van microphoto I).

Gram-preparaat, zonder tegenkleuring.

Formaline-methode.

Microphoto III. Vergrooting 2000 \times .

Haemophil, bipolair staafe. 24 uur oude cultuur op Tocunaga-agar.

Gram-fuchsine-preparaat.

Watermethode.

De bipolariteit is niet te zien.

Microphoto IV. Vergrooting 2000 \times .

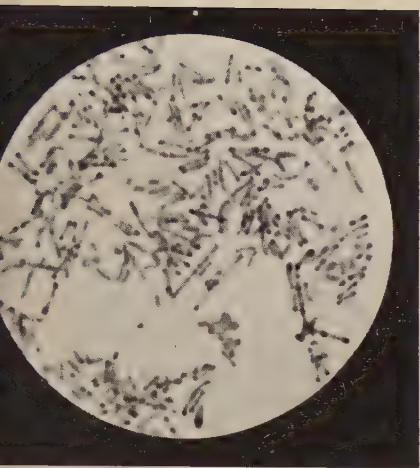
Hetzelfde staafe, van dezelfde cultuur als bij Microphoto III.

Gram-fuchsine-preparaat.

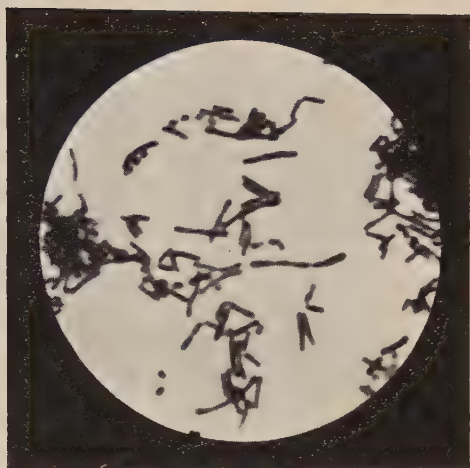
Formaline-methode.

De bipolariteit is zeer duidelijk.

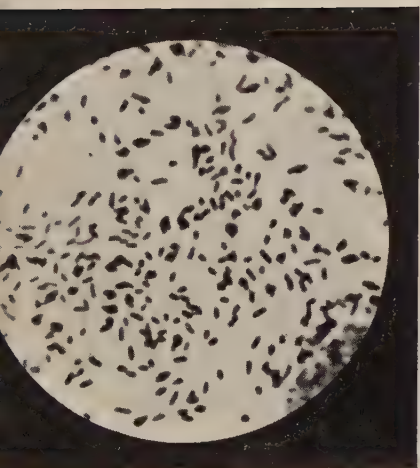
³²⁾ Daar de oorspronkelijke microphoto's iets verkleind gereproduceerd zijn, is de vergrooting op de afbeeldingen ruim 1500 \times .



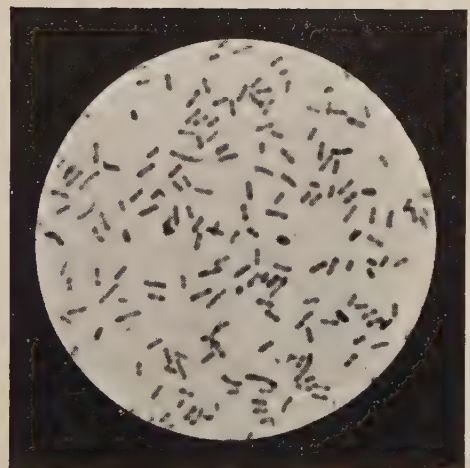
Microphoto Nr. I.



Microphoto Nr. II.



Microphoto Nr. III.



Microphoto Nr. IV.

Een mededeeling over het kweken van visschen
in de langzame zandfilters te Makassar (N. O. I.)
met het doel den looptijd der filters
te verlengen

DOOR

Dr. SARDJITO.

(Antwoord op de opmerkingen van Dr. Baars).

Naar aanleiding van mijn vorige mededeeling (in dit tijdschrift deel I No. 2) over dit onderwerp heeft Dr. Baars bezwaren geopperd, omdat 1e de algen-groei op het filterzand op een andere wijze tegengegaan kan worden z.i. beter beantwoordende aan het doel van de werking der biologische- of langzame zandfilters om den looptijd te verlengen, en 2e omdat de visschen met haar afvalproducten en mechanische beschadiging aan de filters toch niet zoo onschuldig kunnen zijn, zoodat de voordeelen van de werking der visschen niet opwegen tegen de verontreiniging die ze veroorzaken.

Er heerscht blijkbaar bij de kennisname van mijn mededeeling een misverstand.

Bij de inleiding immers heb ik ondubbelzinnig gewag gemaakt, van een bestaanden toestand van waterfilters, welke ik bij mijn komst in Makassar aantrof, een toestand lijnrecht tegen de huidige opvatting van waterfiltratie, waarover ik zeer verwonderd was. Nog grooter was mijn verwondering, toen het bleek, dat het effluent, ondanks de dagelijksche beschadiging van het filtervlies door de visschen, steeds bacteriënarm was; daar kwam nog bij, dat de visschen de levensduur van de filters verlengden. Voor mij was dan ook het primaire, de vraag: „Hoe komt het, dat ondanks de gemaakte gaten in het filtervlies het filtraat goed blijft?” en niet het probleem, hoe

men de ontwikkeling van het filtervlies op andere wijze kan tegengaan.

Ik zou zeker mijn aandacht aan deze laatste kwestie geschonken hebben, indien het filtraat niet goed ware.

Op grond hiervan meen ik op hetgene, wat Dr. Baars tegen mijn mededeeling schreef, over de verschillende middelen om den algengroei te voorkomen, niet behoeven in te gaan.

Tegen de tweede groep bezwaren van Dr. Baars moge het volgende te berde gebracht worden.

Van de mogelijkheid, dat door kratervormige beschadiging van het filtervlies een groote doorstromingssnelheid komt, met medesleeping van bacteriën en ongerechtigheden zooals Dr. Baars schreef, ben ik bij het schrijven van mijn mededeeling zeker op de hoogte, waarom ik dan ook de meening van Mom aanhaalde, die zich in denzelfden zin als Dr. Baars uitte.

Mogelijk dat deze meening in andere gevallen bewaarheid is, doch dit is niet het geval bij het filterbedrijf in Makassar.

Ook de opmerking, dat de visschen het water met haar ontlasting en andere organische excreta verontreinigen, waardoor het kiemgetal van het effluent verhoogd zou worden, kan ik met mijn proeven niet bevestigen. Noch de bacteriëntallen, noch de permanganaat cijfers zoowel in het ruwe water, als in het effluent van een filter met en van dat zonder visschen, gaven daarvan een aanwijzing. Uit de cijfers van het ruwe water is wel te concludeeren, dat de mogelijke verontreiniging veroorzaakt door de visschen niet hooger was dan de natuurlijke schommelingen der bacteriën- en permanganaatgetallen in het filter zonder visschen.

Dit verschijnsel meen ik terug te kunnen brengen tot de werking der zelfreiniging.

Immers bij de zelfreiniging ziet men een proces, waarbij ten koste van de opgeloste organische stoffen eerst groote hoeveelheden bacteriën zich ontwikkelen. Daarnaast komen de schimmels tot ontwikkeling en later in de reinere zone treft men pas de algen en de hooger georganiseerde dieren aan. Terwijl de bacteriën tot voedsel dienen van protozoën en raderdieren, worden de schimmels en algen door de gelede dieren zooals bosminae en daphniae genuttigd. Al deze microflora en fauna vormen weer een goed maal voor de in dat milieu passende visschen.

Bekijkt men dit proces als een biologisch geheel, dan merkt men op, dat ondanks de excretieproducten van de laagste micro-organismen als de bacteriën, verder die der protozoën, gelede dieren en de visschen, daarenboven nog de detritus massa der algen, het water in haar hoedanigheid steeds reiner wordt n.l. van de polysaprobezone tot de oligosaprobezone, omdat die afvalproducten direct verwerkt worden door dezelfde flora en fauna, die de oorspronkelijke organische stoffen assimileeren. Daarbij zal de mate van verontreiniging veroorzaakt door deze afvalproducten, nooit grooter zijn, dan die welke men pleegt te vinden in het stadium van de oligosaprobezone, want anders kan men immers niet spreken van zelfreiniging. Daarom is dan ook geen verschil in bacteriënggetallen en permanganaatcijfers in het ruwe water van het filter met en dat zonder visschen aan te toonen.

Een sterker bewijs tegen het bezwaar van Dr. Baars is het feit, dat de visschen voor mijn komst in Makassar in Februari 1930 reeds jarenlang in de filters zwommen en verder dat die toestand tot op heden ten dage in het jaar 1935 onveranderd is gebleven, terwijl er in al die jaren nog geen reden, noch in den vorm van sterke bacteriën, noch in den vorm van verhoogde organische verontreiniging of haar ontledingsproducten in den vorm van nitraten, nitrieten enz. van het filtraat gevonden wordt om de visschen uit de filters te verwijderen.

Hierbij dient in aanmerking genomen te worden, dat de visschen steeds in het ruwe water boven het filterzand leven met korte onderbrekingen, n.l. als de filters gereinigd worden. In deze korte perioden worden ze in een bak gevuld met reinwater verplaatst. De *Puntius Javanicus*, die gebruikt werden ook voor de proef waren afkomstig van den Dienst der Binnenvisscherij. Daar ze nog zoo klein waren, werden ze een paar maanden in een voorkweek gedaan. Derhalve behoeft de vrees, als zou men de benodigde visschen uit rivieren halen met kans van faecale verontreiniging, niet te bestaan.

In het kort zijn de hoedanigheden van het effluent van de filters met visschen in Makassar tegen de geopperde bezwaren van Dr. Baars in, bevredigend te noemen.

Nog eens de aanwezigheid van visschen in de langzame zandfilters te Makassar

DOOR

F. BEZEMER.

(Hoofd Gewestelijk Laboratorium D.V.G. te Makassar).

De mededeelingen van Dr. Sardjito¹⁾ over bovengenoemd onderwerp in No. 2 en de bestrijding ervan door Dr. Baars²⁾ in No. 4 van dit Tijdschrift, zijn voor mij aanleiding de resultaten mede te deelen van ons onderzoek, het bovenaangehaalde onderwerp betreffend.

Voor een juist begrip zij opgemerkt dat de reiniging van het oppervlakte-water in de drinkwater-installatie te Makassar geschiedt, achtereenvolgens door voorbezinking, bezinking, aluminium-sulfaatklaring, voorfiltratie, eindfiltratie, chloreering, waarna een drinkwater wordt afgeleverd dat, blijkens dagelijkse bacteriologische contrôle, aan de hoogste eischen van hygiënische betrouwbaarheid voldoet.

Bij mijn komst te Makassar in 1932 waren, op grond van de adviezen van mijn voorgangers bij het Gewestelijk Laboratorium, in de eindfilters der langzame zandfilterinstallatie visschen gebracht. Hoewel ik tegen deze handelwijze wel eenige bedenkingen had, was de beheerder der Drinkwaterleiding zoozeer geneigd aan de aanwezigheid der visschen een langeren loopduur der filters toe te schrijven, dat ik de zaak onveranderd gelaten heb.

De reeds geciteerde publicatie van Sardjito bracht mij er echter toe **deze quaestie** nog eens nauwkeuriger te onderzoeken, en wel voornamelijk naar aanleiding van het feit dat zijn tegen-

¹⁾ Anthonie v. Leeuwenhoek 1934, blz. 118.

²⁾ Anthonie v. Leeuwenhoek 1934, blz. 297.

over elkaar geplaatste resultaten der filters B (met visschen) en E (zonder visschen) (zie tabel I, op blz. 122 bij Sardjito) m.i. niet goed vergelijkbaar zijn. Uit genoemde tabel blijkt immers dat slechts in de maand Augustus beide filters gelijktijdig werden onderzocht. Daar nu de samenstelling van het aan de filterinstallatie toegevoerde ruwe water van maand tot maand wisselt, met name de verhouding rivierwater-zakwater schommelingen te zien geeft, dus de door Sardjito gevonden langere levensduur van het filter met visschen i.c. wel een gevolg van de andere samenstelling van het ruwe waetr zou kunnen zijn, leek het mij van belang het onderzoek nog eens te herhalen onder werkelijk gelijke omstandigheden.

Daarenboven hebben wij wat meer aandacht geschonken aan de chemische samenstelling van influent en effluent, zoodat naast het KMNO_4 -getal ook ammoniak, proteïd- NH_3 , nitriet en nitraat op geregelde tijden zijn bepaald.

Op 9 October 1934 waren gelijktijdig schoongemaakt de eindfilters A en E. In E werden visschen (wadder) gebracht, in A daarentegen niet.

In de tabellen I en II zijn de verschillende vergelijkende onderzoekresultaten over $3\frac{1}{2}$ maand overzichtelijk gerangschikt.

Wanneer men deze verschillende uitkomsten nader bekijkt dan blijkt hieruit dat:

1e. de looptijd van het filter A zonder visschen, 113 dagen was, en die van het filter E met visschen, 119 dagen, een onbetekenend verschil ten gunste van het eindfilter met algen-verslindende visschen.

2e. van een ongunstigen invloed der visschen op de hoeveelheid organische stof en de stikstof bevattende ontledingsproducten niet kan worden gesproken, beurtelings waren n.l. in eindfiltraat A of in eindfiltraat E de getallen hooger, herhaaldelijk ook in beide gelijk; een toename ten opzichte der waarden van het water op de filters werd niet gevonden.

De door Dr. Baars naar voren gebrachte bezwaren tegen de methode van algen-vrij maken der eindfilters door visschen blijken dus wel vnl. van theoretische waarde te zijn.

Daar echter de vischreinigings-methode inderdaad indruischt tegen het beginsel der, overigens in haar fijnere wezen nog geenszins volledig doorgronde, biologische zandfiltratie en genoemde principieel onjuiste handelwijze daarenboven, blijkens

TABEL 1.

Vergelijkend bacteriologisch onderzoek van het filtraat der filter.
A (zonder visschen) en E (met visschen).

Datum	Monster filtraat der eindfilters A en E	Kiemgetal	Glucose titer	Lactose titer	Eijkman titer	Lapetan		Coli aerogenes groep	Debiet L./sec.	Weerstand in cm.
						T. Na	Gal			
						titer				
12. 10. '34.	A (zonder visschen)	33	15+	100+	100—	100—	100+	+	5	1
	E (met visschen)	29	15—	15+	100—	100+	100—	+	5	1
15. 10. '34.	A	9	15—	100+	100—	100—	100+	+	5	0
	E	8	15—	100+	100—	100—	100—	+	5	0
22. 10. '34.	A	14	5+	100+	100—	100—	100—	—	5	0
	E	24	10+	115—	100—	100—	100—	—	6	1
29. 10. '34.	A	28	5+	115—	100—	100—	100—	—	5	0
	E	17	5+	115—	100—	100—	100—	—	6	0
3. 11. '34.	A	27	10+	100+	100—	100—	100—	—	5	1
	E	22	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	0
12. 11. '34.	A	48	1+	115—	100—	100—	100—	—	5	3
	E	28	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	1
19. 11. '34.	A	98	1+	115—	100—	100—	100—	—	6	1
	E	15	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	6
26. 11. '34.	A	97	1+	115—	100—	100—	100—	—	5	0
	E	15	15—	115—	100—	100—	100—	—	4½	3
3. 12. '34.	A	126	1+	115—	100—	100—	100—	—	5	2
	E	6	15—	115—	100—	100—	100—	—	4½	26
11. 12. '34.	A	24	1+	115—	100—	100—	100—	—	6	2
	E	8	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	30
17. 12. '34.	A	5	5+	100+	100—	100—	100—	—	5	1
	E	4	10+	115—	100—	100—	100—	—	4	39
24. 12. '34.	A	17	5+	115—	100—	100—	100—	—	5	3
	E	23	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	29
31. 12. '34.	A	34	5+	115—	100—	100—	100—	—	5	40
	E	17	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	15
9. 1. '35.	A	26	15+	115—	100—	100—	100—	—	5	40
	E	34	15+	115—	100—	100—	100—	—	4	10
14. 1. '35.	A	17	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	56
	E	12	15—	115—	100—	100—	100—	—	4	20
21. 1. '35.	A	17	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	39
	E	12	15—	115—	100—	100—	100—	—	4	29
28. 1. '35.	A	7	15—	115—	100—	100—	100—	—	5	88
	E	1	15+	115—	100—	100—	100—	—	4	40
29. 1. '35.	A	wordt schoongemaakt								
4. 2. '35.	E	88	15—	100+	100—	100—	100—	—	4	74
5. 2. '35.	E	wordt schoongemaakt								

Eindfilter A 113 dagen in bedrijf geweest.

Eindfilter E 119 dagen in bedrijf geweest.

ons onderzoek geen werkelijke voordeelen oplevert, zijn thans de visschen uit de eindfilters verwijderd en wordt de hinderlijke algengroei tegengegaan door een hiertegen gerichte voorbehandeling van het te filtreren water.

TABEL 2.

Datum	Monster water	Kalium- permanga- naatgetal	NH ₃ mgr/L	proteïd NH ₃ mgr/L	NO ₂ mgr/L	NO ₃ mgr/L
15 Oct. '34	Op Eindfilter A (zond. visschen)	3.8	0	0.2	0	0.05
	Op Eindfilter E (met visschen)	1.3	0	0.05	0	0.15
	Filtraat Eindfilter A	0	0	0	0	0.05
	Filtraat Eindfilter E	0	0	0	0	0.15
29 Oct. '34	Op Eindfilter A	4	spootje	0	0	0.10
	Op Eindfilter E	2.5	spootje	0.05	0	0.3
	Filtraat Eindfilter A	0.15	0	0	0	0.05
	Filtraat Eindfilter E	0.15	0	0	0	0.3
12 Nov. '34	Op Eindfilter A	9.5	spoor	0.25	0	0.15
	Op Eindfilter E	3.9	0	0.1	0	0.15
	Filtraat Eindfilter A	0.15	0	0	0	0.3
	Filtraat Eindfilter E	0.3	0	0	0	0.2
26 Nov. '34	Op Eindfilter A	2.1	0	0.15	spoor	0.3
	Op Eindfilter E	2.2	0	0.15	0.05	0.3
	Filtraat Eindfilter A	0	0	0	0	0.3
	Filtraat Eindfilter E	0	0	0	0	0.3
12 Dec. '34	Op Eindfilter A	5.2	0	0.1	spoor	0.3
	Op Eindfilter E	5.5	0	0.1	0.05	0.3
	Filtraat Eindfilter A	0.15	0	0	0	0.3
	Filtraat Eindfilter E	0.15	0	0	0	0.3
24 Dec. '34	Op Eindfilter A	0.8	0	0.05	spoor	0.3
	Op Eindfilter E	1.4	0	0	spoor	0.3
	Filtraat Eindfilter A	0.2	0	0	0	0.2
	Filtraat Eindfilter E	0.8	0	0	0	0.3
4 Jan. '35	Op Eindfilter A	6.9	0.2	0.3	0.1	0.3
	Op Eindfilter E	3.9	0.1	0.1	1.25	0.3
	Filtraat Eindfilter A	0.15	0	0	0	0.2
	Filtraat Eindfilter E	0.3	0	0	0	0.2

Boekaankondiging.

Beginselen der Algemeene Bacteriologie en Immunitetsleer door Dr. H. W. Julius, Conservator aan de Rijks Universiteit te Utrecht. Met een voorrede van Prof. L. K. Wolff. Uitgever Joh. Enschede en Zonen te Haarlem, 1935. 362 blz. Prijs gebonden f6.90.

Dit boek is allereerst bestemd voor studenten, maar, mij dunkt, ook afgestudeerden zullen het waardeeren.

Het vóór en tegen van het gebruik van in de Nederlandsche taal geschreven studieboeken is bekend en blijve hier dus buiten beschouwing, maar stellig is dit nieuwe Nederlandsche werk een goed boek.

De gevaren van een boek over *algemeene* bacteriologie en immunitetsleer zijn, dat het voor leerlingen spoedig te abstract en vaag of omgekeerd eigenlijk tot een minder overzichtelijk werkje over speciale bacteriologie wordt. Ook dreigt een studie van een algemeene leer gemakkelijk een droog werkstuk te worden; Julius echter schreef een boek, dat boeit.

Het kenmerkende van dit boek lijkt mij, dat het vóór alles wil geven: begrip en inzicht en dan ook niets weg heeft van een compendium-achtige, algemeene groepeerings van feiten. Vermeden is ook, hoewel het boek rijk van inhoud is, bepaald *alle* punten der algemeene bacteriologie te willen „abhandeln“. Zoo wordt b.v. de strijd over de naamgevende stelsels der bacteriën ter zijde gelaten voor de vak-bacteriologen. Bij het betrekkelijk kleine aantal soorten bacteriën, die van medisch belang zijn, kan volstaan worden met de gebruikelijke namen. Ook recepten voor kleurmethodes en voedingsbodems komen in dit boek, dat geen practicum wil zijn, niet voor.

Wil men vergelijking met buitenlandsche boeken, dan is de geest van het werk van Julius nader tot Topley dan tot Hetsch.

Zooals de titel reeds doet begrijpen, is de algemeene bacteriologie geheel uit medische gezichtspunten beschouwd: een niet-medicus had *dit* boek niet kunnen schrijven. De aangehaalde feiten en verschijnselen zijn alle gerangschikt als voorbeeld van of steun voor een vloeiend betoog, dat verloopt volgens een goeden opzet met een logische, scherpe indeeling der leerstof. Daarbij heeft het boek iets opvallend-levendigs door de telkens opgeworpen vragen, die met de vóór en tegen pleitende argumenten en voorbeelden tot overdenking prikkelen.

De colloïd-chemische opvatting der immunitetsreacties, het waarschijnlijke van de leer der uniteit der antistoffen, de groote beteekenis ook van de aspecifieke processen van verweer en der verschillende overgevoelig-

heids-toestanden, het vervloeien van de veranderlijke wetenschap en ook de leemten in onze inzichten worden den lezer steeds-door ingeprent. Na deze meer psychische scholing tot critisch beschouwen, besluit de schrijver nog met een korte mathematische vermaning, in den vorm van de toepassing der waarschijnlijkheidsrekening op de interpretatie van waarnemingen en foutenberekening.

Te zamen, naar mijn meening, een voortreffelijk boek.

Volgen nog een paar detail-opmerkingen:

Ook in kleinigheden blijkt het boek goed verzorgd te zijn; zoo wordt b.v. bij de talrijke verwijzingen naar andere gedeelten van den tekst niet volstaan met een „zooals wij elders opmerkten“, maar wordt het betreffende hoofdstuk en meestal nauwkeurig de bladzijde genoemd; zulks voor een inleidend leerboek belangrijk.

„Het belangwekkende en veel omvattende hoofdstuk der variabiliteit blijve onaangeroerd“ zegt de schrijver. De geënthousiasmeerde lezer vraagt allicht: „waarom wordt mij dit dan onthouden“?

Op blz. 50 staat vermeld, dat paratyphusbacteriën uit glucose gas (CO_2) vormen, hetgeen onvolledig is, daar dit gas ook uit waterstof bestaat. Voorts sprekende over gas- en zuurvorming uit glucose, wordt gezegd, dat typhusbacteriën deze suiker niet zouden veranderen. Hier verwaarloosde a slip of the pen de zuurvorming.

Blz. 203 vermeldt o.a.: Men bepaalt van iemand de bloedgroep door zijn erythrocyten met de sera A (β) en B (α) samen te brengen. Men kan zeggen, dat zulks voor een korte saamvattende bespreking voldoende is. Wie echter een sterfgeval bij bloedtransfusies heeft meegemaakt, wil den leerlingen ten allen tijde als erkende eisch inprenten, dat de groepsbepaling bovendien nog controleerend dient te worden aangevuld door ook het serum van den onderzochte te beproeven op bekende erythrocyten A en B.

J. F. H.

Wat is het leven? door Prof. Dr. J. A. J. Barge. 1935. Leiden—Amsterdam. H. E. Stenfert Kroese's Uitgevers Mij. N.V.

Het is een uitnemende gedachte van Barge geweest de voordrachten, welke hij voor het Leidsche Universiteitsfonds heeft gehouden, in druk te doen verschijnen. Het werk zal zeker in ruimen kring belangstelling vinden.

Immers de vraag naar het wezen van het leven rijst bij hen, die trachten te denken, toch wel voortdurend, ook al wordt nog vaak de meening verkondigd, dat het stellen van de vraag onwetenschappelijk is. Een opvatting, die — zooals Barge terecht opmerkt — intusschen zeker onjuist is, mits niet een antwoord verwacht wordt, dat een zintuigelijke waarneembare demonstratie inhoudt.

In een klaren stijl bespreekt Barge achtereenvolgens leven en stof, leven en doelmatigheid, leven en „gestalte“. Juist de eenvoud der behandeling en de talrijke, veelal sprekende voorbeelden maken de lezing van dit boekje zoo aangenaam en voor degenen, die niet wijsgeerig onderlegd zijn — voor hen is het zeker in de eerste plaats bedoeld — zoo loonend.

De vraag of ik mij met de opvattingen van den schrijver geheel zou kunnen vereenigen — een vraag, die ik ontkennend moet beantwoorden — doet niets af aan mijn groote waardeering voor deze studie; even weinig als mijn meening, dat het, ook in een kort bestek, wel mogelijk zou zijn geweest de leer der entelechien wat duidelijker te omlijnen, dan hier het geval is.

W. Aeg. T.

Die Serum- β -Lysine und die antibakterielle Immunität gegen die davon beeinflussten Mikroben. A. Petterson. 1934. Gustav Fischer, Jena.

Nuttall ontdekte de bactericide werking van bloed op bacteriën. Tevens stelde hij vast, evenals korten tijd later Buchner, dat deze vernietigende kracht van het bloed door verwarming op 55° C werd opgeheven. Later bleek echter, dat wel de bactericide werking van gedefibrineerd bloed door deze verhitting teniet werd gedaan, maar niet die van serum: hiervoor waren hogere temperaturen noodig.

Bij verdere onderzoekingen (Gruber, Futaki, Knorr, e.a.) werd het duidelijk, dat hier zeker twee verschillende stoffen in het spel zijn. Petterson stelde nu voor de Nuttall-Buchnersche Alexinen: serum- α -lysinen te noemen, terwijl hij de ten opzichte van temperatuursverhoogingen meer resistente bacterio-lysinen met den naam serum- β -lysinen bestempelde.

De monographie behandelt deze β -lysinen uitvoerig. In een algemeen gedeelte worden de verschillende eigenschappen besproken: effect van verhitting, gedrag bij dialyse, lichtgevoeligheid, enz.

Gevoelig voor de werking dezer β -lysinen zijn de meest uiteenlopende micro-organismen. Het probleem wordt voorts belangrijk meer ingewikkeld, omdat niet alleen in het serum, maar ook in de polymorphkernige leucocyten en in de thrombocyten stoffen aanwezig zijn, die bacterie-vernietigend werken.

Na deze algemeene besprekingen volgt dan het belangrijkste deel van het boek, dat de bacterieele immuniteit behandelt tegen de, voor β -lysine gevoelige micro-organismen. Vooral het hoofdstuk dat over de pneumococci handelt is zeer interessant.

Al moge men het in sommige opzichten met den schrijver niet eens zijn, omdat hij wel eens wat te ver gaat, toch is de monographie zeer lezenswaard en voor hen, die van dit deel der immuniteit een speciale studie maken, onmisbaar.

W. Aeg. T.

VOORWOORD

Toen ik in 1899 mijn micromanipulator demonstreerde op het Natuur- en Geneeskundig Congres te Haarlem, vermoedde ik zeker niet, dat dit het begin zou zijn van een methodiek, die later op allerlei gebied bij het microscopisch onderzoek zou worden toegepast.

Waar thans de samenvatting van mijn levenswerk in druk verschijnt, is het met den wensch, dat het microscopisch experiment op de levende cel, ook langs dezen weg, ons iets van de geheimen van het wondere leven moge openbaren.

U t r e c h t, Hygiënisch Laboratorium.
April 1935.

S. L. SCHOUTEN.

INLEIDING.

Bij de hogere planten en dieren kunnen wij ons geen biologisch onderzoek voorstellen zonder individueele behandeling en keuze der proefobjecten. De natuurvorscher neemt een bepaalde zaadkorrel of een jonge plant en gaat er de individueele ontwikkeling van na; doet hij fokproeven, dan kiest hij het mannelijk en het vrouwelijk exemplaar individueel uit. Voor de microörganismen heeft men echter een uitzondering gemaakt. De duistere tijden, waarin men nog werkte met onbekende mengsels van soorten, laten wij buiten bespreking. Daarna echter, als de reïncultuurtechniek zich heeft ontwikkeld, is er van individueele behandeling nog geen sprake. Men verdeelt een vrijwel onbekende hoeveelheid cellen in een gelatineplaat en neemt er volkomen genoeg mee, dat 't onbekend blijft, welke zich ontwikkelen en welke sterven en wat er in 't begin van de ontwikkeling gebeurt, daar men 't ontstaan van de kolonie immers niet met de sterkste vergrooing kan controleeren. 't Is een werken „op goed geluk”.

Er bestond geen enkele reden om met dezen toestand tevreden te zijn. Dat men dit langen tijd toch was, is psychologisch wel te verklaren. De gangbare methoden om een reïncultuur te maken, hetzij door uitstrijken op een vast substraat, of door middel van de smeltbare vaste voedingsbodems, waren zóó eenvoudig en de resultaten, er mede bereikt, dikwijls zóó schitterend, dat men voorloopig geen behoefte gevoelde aan een andere wijze van onderzoek. Gaandeweg echter, naarmate de microbiologie zich ontwikkelde, veranderde dit. De vraag naar een andere reïncultuurtechniek kwam 't eerst naar voren toen men zag, dat in veel gevallen Koch's plaatcultuur niet voldoende zekerheid gaf. Want, al mag dit bij niet-samenklevende

cellen, vooral bij herhaalde toepassing, het geval zijn, bij samenlevend materiaal verandert de zaak geheel. Ik behoef hier waarlijk niet uit te weiden over de kans op fouten, vooral als men werkt met hardnekkig agglutineerende schimmelsporen, in slijm voorkomende bacteriën of in korsten groeiende fungi, zooals b.v. die van de dermatomycosen. En nu tracht men wel, vooral in 't laatste geval, door kunstgrepen (b.v. door te wrijven met glaspoeder) de cellen te scheiden, waarbij men zeker, hoe krachtiger men 't middel toepast, ook des te meer bereikt; toch zal men — afgezien nog van de kans op beschadiging — daardoor nooit alle cellen geïsoleerd krijgen. 't Is duidelijk dat in deze gevallen het isoleeren van één cel onder het microscoop de eenige betrouwbare methode is.

Nog sterker echter deed de behoefte aan een andere werkmethode zich gevoelen, toen men bij herhaling in aanraking kwam met problemen, waarvan het toch wel zéér duidelijk is, dat de oplossing alleen door individueele behandeling van micro-organismen is te vinden. Men ziet b.v. bij variabiliteitsproeven afwijkende cellen; wil men nu de hoogst belangrijke vraag beantwoorden, welke nakomelingschap daaruit zal ontstaan, dan moet men die cellen onder het microscoop kunnen isoleeren. Een ander geval is de brandende kwestie van den levenscyclus der bacteriën (onderstelde splitsing in kiemkorrels en filtreerbare vormen, optreden van een slijmstadium, enz.). Deze kan niet worden opgelost door microfoto's van culturen op verschillende leeftijd, maar moet worden beslist door, onder het microscoop, één cel of korrel te isoleeren en de verdere ontwikkeling na te gaan.

Nu kan men op meer dan één manier aan dezen eisch der individueele behandeling voldoen, al naar gelang men zijn ideaal wat hooger of wat lager stelt. Men kan zich tevreden stellen met het maken van een absolute reincultuur uit een cel, *die zich daartoe min of meer toevallig voordoet* in een der druppeltjes, die men op een dekglas heeft afgezet. De oudere mycologen, b.v. de B a r y, deden dit het eerst met schimmelsporen; later deden L i n d n e r en B u r r i het met bacteriën, B u r r i na toevoeging van Oostindische inkt, teneinde een contrast tusschen wit en zwart te krijgen. Men kan ook het materiaal uitgieten in een zeer dunne plaat, om dan de ontwikkeling van afzonderlijk terecht gekomen cellen onder het microscoop na te gaan.

Hansen deed dit met gistcellen, Ørskov doet dit met bacteriën.

Voor mij persoonlijk is het ideaal geweest: het *welbewust uitzoeken en terstond afzonderen van bepaalde cellen* — al zouden het de eenige afwijkende zijn te midden van duizende normale — of *van cellfragmenten*, en wel, teneinde bij zeer kleine objecten vergissingen uit te schakelen, in uiterst kleine, kristalheldere, niet-verdampende, neutrale vloeistofdruppeltjes; daarna de contrôle, bij sterkste vergrooting, van de eerste ontwikkelingsstadiën. Later kwam daarbij het anatomisch en fysiologisch onderzoek van de enkele cel, dus het betasten en aanboren met naalden, het doorsnijden met micro-mesjes, enz. Dit was te verwachten. Bij macroscopisch onderzoek zal niemand zich tevreden stellen met beschouwing alleen, dus zonder aanraking van de objecten. Waarom zou men dan, als het de eencelligen bij het microscopisch onderzoek betreft, met een totaal onvoldoende techniek genoeg moeten nemen?

Wat het uitgangspunt en de ontwikkeling van deze methodiek betreft, moet ik teruggaan tot 1897. Op een college in de microbiologie, gegeven door Prof. Went, was mijn aandacht getrokken door de mededeeling, dat het aan sommige onderzoekers wel gelukt was druppels met één schimmelspore te isoleeren, maar dat dit voor bacteriën onmogelijk was. De gedachte was toen in mij opgekomen een poging in die richting te wagen en als resultaat kon ik in den zomer van 1897 een primitief apparaatje toonen, waarmede ik grootere bacteriën overbracht van den eenen druppel in een anderen. De naalden waren van zeer fijn metaal draad, in een oog omgebogen. De uitwerking van dit principe demonstreerde ik op het Natuur- en Geneeskundig Congres te Haarlem in 1899. Oorspronkelijk werd het apparaat alleen gebruikt voor het isoleeren, soms ook voor het combineren, van microörganismen, waarom ik het daarom ook isolatietoestel noemde. Fig. 1 is een reproductie uit dien tijd ¹⁾, waaruit men zien kan, dat het principe van den bouw van het thans gebruikte instrument toen reeds vaststond. Dat de methode van

¹⁾ Een methode voor het maken van reinkulturen, uitgaande van één onder het mikroskoop geïsoleerde cel. Handelingen v.h. 7e. Nederl. Nat. en Gen. Congres, Haarlem 1899 p. 325. (Zie ook: Centralbl. Bakt. 1e Abt. 1901 p. 363).

het isoleeren sindsdien ook weinig veranderd is, blijkt duidelijk uit Fig. 2, een andere reproductie uit dezelfde publicatie. ¹⁾ De naalden werden daarbij slechts in één richting, n.l. op en neer, bewogen. Vrij spoedig ²⁾ werd bovendien gebruik gemaakt van kleine bewegingen in horizontale richting. Later, toen het kwam tot microöperatie's onder het microscoop, bleek een beweging in 3 richtingen van de ruimte over groteren afstand noodig. Het apparaat, dat hiertoe in staat stelt, wordt beter met den naam van micromanipulator aangeduid. Bij het vaststellen van dezen naam is 't niet overbodig er op te wijzen, dat het apparaat zich niet leent voor grove techniek. Herhaaldelijk heb ik moeten constateeren, dat men er te groote organismen of weefsels mede wilde behandelen. 't Is echter geen *macromanipulator*! De techniek in haar geheel kunnen wij met den naam van microtechniek aanduiden; wij kunnen daarbij dan onderscheiden het isoleeren en de microöperaties.

't Was te voorzien, dat ik op dit gebied niet alleen zou blijven. Ik noem o.a. de later vervaardigde micromanipulatoren van *Barber* (1904), *Chambers* (1921) en *Peterfi* (1923), die, met hun leerlingen, op het gebied van isolatietechniek en micrurgie belangrijke resultaten hebben bereikt. De verschillen tusschen hun apparaten en het mijne zijn reeds te zien aan de afbeeldingen. Ik zal er hier niet over uitweiden, daar deze verhandeling niet bedoeld is als leergang der microtechniek in het algemeen, maar ik er alleen resultaten van eigen werk in wil mee-deelen; daarom zal men hier ook tevergeefs een uitgebreide literatuuropgave zoeken. Alleen wil ik er op wijzen dat, behalve in de apparaten, een belangrijk verschil óók gelegen is in de naalden. De vorm hiervan wordt beslist door de vraag, wat men er mede wil bewerken. Sommige onderzoekers bewegen zich op het terrein van de histologie der hoogere organismen, andere

¹⁾ l.c. p. 328.

In Fig. 2a ziet men rechts den rand van den druppel met bacteriën, enz.; links de condensatie-druppeltjes, als pareltjes op het dekglas zittend, wat ik destijds bereikte door inwrijven met vaseline. Van de oogvormige naald, die schuin naar boven staat, is in Fig. b, c, d, f en g alleen het bovenste gedeelte geteekend.

²⁾ Reinkulturen uit één onder het microscoop geïsoleerde cel. *S. L. Schouten*. Proefschrift 1901 (Zie ook: *Centralbl. Bakt.* 1e Abt. 1901. p. 780).

werken met bacteriën en zelfs fragmenten van bacteriën; ze zullen verschillende naalden en micromessen noodig hebben. 't Ideaal is natuurlijk een uitrusting, waarmede men zoowel de grootere objecten (b.v. eicellen) als de kleinste (b.v. granula van bacteriën) kan behandelen, en een apparatuur om de naalden in alle gewenschte vormen te vervaardigen.

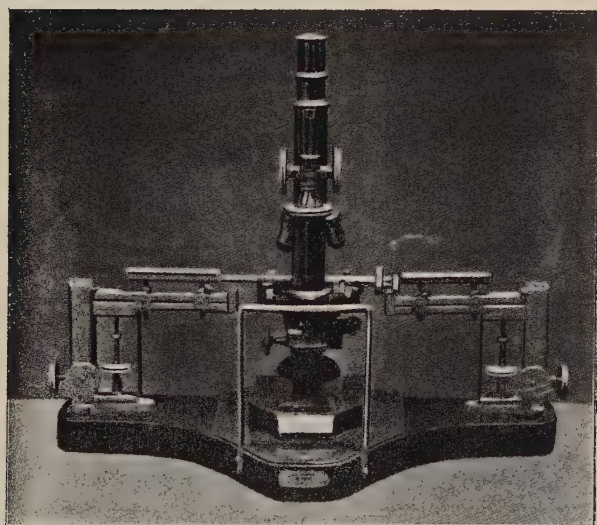
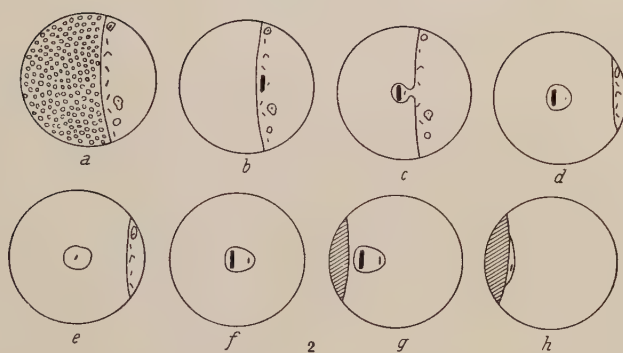
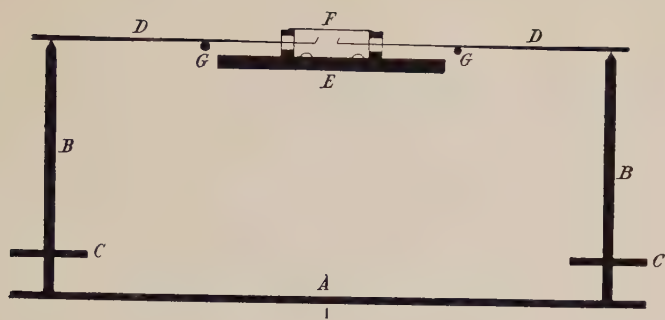


Foto Dr. H. W. Julius

HOOFDSTUK I.

De Micromanipulator.

A. Het apparaat.

De statieven, die de naalden dragen waarmede gewerkt wordt, zijn bevestigd op een zwaren gietijzeren voet. [Fig. 3 ¹⁾]. Tusschen beide in staat het microscoop, dat kan worden verschoven, doordat het rust op een gepolijste plaat, die op den voet is bevestigd. Dit geschiedt op betrouwbare en nauwkeurige wijze, als men beide handen, met duim en middenvinger gedrukt tegen de zijkanten van den microscoopvoet en tevens op de gepolijste plaat, aan weerszijden van het microscoop plaatst. Een inrichting om het microscoop in een bepaalden stand vast te zetten, heb ik met opzet niet aangebracht, want daar deze verschuivingen nogal veel plaats hebben, zouden ze in het geregelde werk hinderen. Een beugel van zwaar koperdraad, aan de voorzijde van het apparaat, dient om te voorkomen dat men, bij het werken voorover buigende, met gevaar voor de naald het microscoop van zijn plaats zou stooten.

Het apparaat is berekend op de groote modellen van de bekende fabrieken. Deze kunnen — tenzij de bouw nog massiever wordt — alle, wat de breedte van de objecttafel betreft, tusschen de naaldhouders staan, terwijl de naalden in verband met de verschillende hoogten, gemakkelijk hooger of lager kunnen worden ingesteld. Op kleinere modellen, die voor microbiolo-

¹⁾ In dezen vorm is de micromanipulator vervaardigd sinds 1928. Op enkele laboratoria zijn nog toestellen in gebruik, die van vóór dien tijd dateeren, sommige zelfs met naalden (of met één naald!), waarbij de beweging slechts op één manier, nl. op en neer, kan plaats hebben. Ik behoef niet te zeggen, dat deze toestellen veel minder bruikbaar zijn.

gisch werk allicht niet in aanmerking komen, is dus niet gerekend. Mocht niettemin een microscoop te laag van tafel blijken, dan kan dit altijd worden verholpen door onder aan het statief drie voetjes te bevestigen, of — bij sommige fabrikaten — een koperen schijf in de kolom aan te brengen. In het tegenovergestelde geval kan men de naaldstatieven verhoogen.

Voor het bewegen van de naalden in drie richtingen van de ruimte is niet het gewone systeem van in elkaar glijdende sleden gebruikt. Een op dit principe gebouwd apparaat is gecompliceerd en duur. Wil toch zulk een systeem goed functionneeren, dan moet alles met de uiterste nauwkeurigheid in elkaar passen; men bedenke slechts, dat de bewegingen met de sterkste vergrooting gecontroleerd worden! Daarom zijn draaiende assen, waarbij een kleine fout in 't centrum een onnauwkeurige beweging der naalden tengevolge zou hebben en is ook alle mechaniek, waarbij groote vlakken over elkaar moeten glijden, vervangen door eenvoudiger bewegingen. Een blik op Fig. 4, waarin een schematische voorstelling van de beweging der naald is gegeven, moge deze gedachte verduidelijken.

Hierin zijn G breede, sterke veeren, die de staaf H dragen. Met schroef A kan men den naaldhouder in zijn geheel in het vlak van teekening a.h.w. verbuigen, zoodat de punt van de naald (links boven in de figuur) zich van rechts naar links en terug beweegt. Daartoe drukt A tegen de onderzijde van den hefboom D, die om O draaibaar is en die van boven door middel van een trekstang J aan H is bevestigd. K is een omgebogen veer, die 2 verschillende bewegingen toelaat. Ten eerste kan in iedere stand, die door A aan de veeren G is gegeven, de staaf L, en dus ook de glazen naald, eenige graden in het vlak van teekening draaien, waardoor de punt van de naald onder het microscoop op verschillende diepte kan worden ingesteld. Voor deze beweging dient de schroef C. Indien de as van deze schroef gewoon doorliep en tegen de onderzijde van L drukte, zou de daar ontstane wrijving en ook de geringste slingering van de as een onregelmatige beweging van de punt van de naald in het gezichtsveld tengevolge kunnen hebben. Daarom is de as gebroken; het bovenste deel, de losse staaf F, rust van onderen in een holte van de as van C, en van boven in een holte van L. K maakt echter door zijdelingsche torsie nog een tweede beweging mogelijk; daardoor kan L in een vlak, loodrecht op het

vlak van teekening, eenige graden draaien. Hiertoe dient de hefboom E, die om P draaibaar is door middel van de daartegen drukkende schroef B en met een kogelvormig uiteinde het gepolijste uiteinde van L met een minimum wrijving raakt.

Door dit eenvoudige systeem is een regelmatige beweging van de naald in het gezichtsveld, in drie richtingen van de ruimte, gewaarborgd.

Behalve de rustige bewegingen door middel van de schroeven A, B en C zijn nog zeer snelle bewegingen mogelijk door met een vinger te drukken tegen de veer G, of zijdelings tegen het achtereinde van L; of door de staaf F op te beuren aan het daaraan bevestigde rondsel. Door dit laatste te doen kan men b.v. groote, snel zwemmende infusoriën vangen; door het eerste kan men taaie celwanden met een snellen stoot doorboren. Aan den anderen kant zijn ook zeer kleine bewegingen mogelijk (zoo klein, dat men ze met de fijne schroeven van het apparaat nauwelijks kan te voorschijn roepen), wanneer men zacht tegen de micrometerschroef van het microscoop drukt. Op deze manier zet men b.v. zonder moeite een bacterie op de punt van een naald, of snijdt men er een doormidden. Desverkiezend kan men hierbij de hand op de een of andere wijze ondersteunen. De mogelijkheid van deze onmisbare wijze van beweging is te danken aan het feit, dat het microscoop op een eenigszins veerende onderlaag staat, de bovengenoemde gepolijste ijzeren plaat. Deze, die met drie schroeven in de gietijzeren voet is bevestigd, rust op drie om de schroeven aangebrachte kartonnen ringetjes. Men kan de beweging in kwestie nog naar willekeur regelen door deze schroeven vaster of losser aan te draaien. Door de drukking tegen de micrometerschroef (die het meeste effect heeft, als deze hoog aan het microscoop is aangebracht) zakt deze plaat iets door en wordt het microscoop, met het preparaat, iets uit zijn evenwichtsstand gebracht, terwijl de punt van de naald op haar plaats blijft; in het gezichtsveld maakt het echter den indruk, alsof het preparaat — dus b.v. de bacterie — op de plaats blijft en de naald zich beweegt. 't Is duidelijk, dat dit een ideale wijze van beweging is; immers heeft men bij het werk tóch altijd de micrometerschroef in de hand, terwijl men de naald zich ziet bewegen in dezelfde richting, waarin men drukt. Zodoende krijgt men den indruk, alsof de natuurlijke beweging van de hand duizendvoudig verfiijnd wordt.

De andere hand heeft dan slechts voor één schroef, n.l. C, te zorgen, daar A en B niet noodig zijn. Beide handen blijven dus rustig in denzelfden stand, zoodat men den toestand in het gezichtsveld volkomen beheerscht. Stonden de naaldhouders niet los van het microscoop, maar waren ze aan de objecttafel bevestigd, dan zou deze bewegingsmogelijkheid niet bestaan.

't Is van belang, dat de schroeven A, B en C goed loopen. Een spoortje doode gang is zeker beter dan dat ze te stroef gaan en hindert ook absoluut niet; bovendien kunnen de fijnste bewegingen toch altijd gemaakt worden door drukken tegen de micrometerschroef van het microscoop en dus buiten A, B en C om. Ze moeten zoo gemakkelijk gaan, dat de aanraking van het rondsel met één vinger al voldoende is. Dit wordt desgewenscht nog vergemakkelijkt, indien om de rondsels gummiringetjes worden gelegd. Men smeert de schroeven af en toe met wat fijne machine-olie; hetzelfde doet men met de vorken, waarin D en E om O en P draaien.

Men heeft er rekening mede te houden, dat de schroeven A en B over een afstand van ± 6 mm (12 windingen) werken, wat ook voldoende is, daar toch grootere verplaatsingen altijd gebeuren door verschuiving van het microscoop op de gepolijste plaat. 's Is intusschen onaangenaam plotseling te bemerken, dat de naald zich niet verder beweegt; daarom doet men verstandig onder het werk af en toe te zien of de schroefstand niet te ver van het gemiddelde, n.l. 3 mm buiten de moer, verwijderd is. Wat schroef C betreft, zorg men, dat de naald zich vrij in de spleet van de isoleerkamer kan bewegen. De staaf L stuit bij den hoogsten stand tegen het plaatje, dat de holle kolom afdekt, waarin zich D en E bevinden; in den laagsten stand komt L op H te rusten, wat men bemerkt door een plotselinge zijwaartsche beweging van de naald; men doet beter dit te voorkomen.

De tafel, waaraan men werkt, mag niet doorbuigen; ze wordt, zoo nodig, extra gestut. Heeft men last van de trillingen van het stadsverkeer, dan zet men het voetstuk van den micromanipulator op poreuze gummi; zeer goed leent zich hiertoe de bekende gummispons.

Bij den bouw van het apparaat is naar de grootst mogelijke eenvoud gestreefd. Ten eerste om het werken er mee zoo gemakkelijk mogelijk te maken. Men kan alle bewegingen met de

drie schroeven maken, terwijl de hand rustig op de tafel naast de naaldhouder blijft liggen; groote bewegingen bij het grijpen van ver uit elkaar liggende schroeven zijn dus onnoodig, wat ik bij het uiterst fijne werk, waarom het hier gaat, een eerste eisch acht. Ten tweede om den prijs zoo laag mogelijk te houden en daardoor het apparaat onder veler bereik te brengen. In de toekomst zal menig microbioloog de noodige micrurgische vaardigheid moeten bezitten. Vermoedelijk is op het vinden van den eenvoudigen vorm onbewust van invloed geweest de omstandigheid, dat ik de eerste apparaten zelf vervaardigde en daarna allerlei wijzigingen ook zelf aanbracht. Wie zoo gemakkelijk een instrumentmaker tot zijn beschikking heeft, pijnigt zich niet om de eenvoudigste constructie te bedenken!

Tenslotte voegt het mij een woord van waardeering uit te spreken voor het werk van de instrumentmakers J. Vink en H. M. Smitt, wier rijke ervaring op technisch gebied mij later van veel nut is geweest.

B. De naalden.

Wat mijn methode van andere werkwijzen onderscheidt, is o.a. het principe om niet voor iedere isolatie een nieuwe naald te maken, maar altijd met dezelfde naalden te werken. Dit hangt samen met den vorm. Terwijl pipetten telkens opnieuw gemaakt moeten worden, worden de naalden, waarvan de beschrijving hier volgt, gebruikt totdat ze verweerd of niet voldoende scherp meer zijn. Ik heb met een en dezelfde oognaald 5 jaar en langer gewerkt; dan wordt ten slotte soms het glas wat ruw, zoodat de cellen neiging hebben er aan vast te kleven, wat niet aangenaam werkt. En een glazen mesje wordt bot, evenals de loodrecht het glas aanrakende punten, waarmede weefsels worden ontleed. Zulke naalden vervangt men dus door nieuwe. Voorts heb ik als principe aangenomen, teneinde oligodynamische werking buiten te sluiten: geen metaal in aanraking met geïsoleerde cellen. Daarom zijn ze alle van glas, uitgezonderd het stalen mesje, dat alleen voor grovere objecten dient.

De meest voorkomende werkzaamheden konden tot hiertoe met een negental naalden en mesjes, een micropincet en een micropipet verricht worden. Het zijn:

- No. 1. Een fijne oog-vormige naald voor het isoleeren van bewegelijke bacteriën; van onbewegelijke, mits niet te sterk aan het dekglas klevend; van gistcellen, schimmel-sporen, celfragmenten, mits zoo klein, dat ze niet in het oog blijven vastzitten;
- No. 2. een middensoort oog-vormige naald, voor cellen die te groot zijn voor No. 1, dus voor protozoën, groote schimmelsporen, enz.;
- No. 3. een groote oog-vormige naald, voor groote organismen, b.v. Paramaecium; voor het afzetten van kleine druppels onder het microscoop; voor het verspreiden van materiaal in kleine druppels of, droog uitgetrokken, in strepen;
- No. 4. een fijne puntnaald, waarmede bacteriën, stukken van hyphen enz. van het dekglas kunnen worden opgenomen;
- No. 5. een grovere puntnaald, waarmede geïsoleerde cellen ten slotte in den cultuurdruppel worden geschoven;
- No. 6. een glazen mesje, voor het doorsnijden o.a. van bacteriën, hyphen, enz.;
- No. 7. een stalen mesje, voor grovere objecten;
- No. 8. een scherpe puntnaald, voor het doorsnijden van bacteriën, infusoriën enz.
Wordt ook gebruikt, aan de punt voorzien van een gelatine-bolletje, voor het opnemen van fijne korrels;
- No. 9. een loodrecht naar boven staande naald, voor het losmaken van cellen of celfragmenten uit weefsels;
- No. 10. een micropincet, voor het vasthouden van grootere objecten en weefsels;
- No. 11. een micropipet, voor injectie van vloeistoffen in cellen.
Bovendien een oefennaald, waarmede aanvangs beginnen.

De naalden Nos. 1—10 worden, in dezelfde volgorde, geborgen in 2 kistjes. Micropipetten worden met de punt onder water bewaard. Wie met den micromanipulator werkt, zal bovendien ook nog wel eens andere naalden willen gebruiken. Zoo leent een scherpe punt, maar steviger dan no. 8, zich zeer goed voor het aanboren van celwanden.

Voor den vorm der naalden, zie Hoofdst. IV.

Bij de beantwoording van de vraag, welke naalden in 't linker en welke in 't rechter statief gebruikt zullen worden, gelden de volgende overwegingen:

De schroeven van de bewegelijke objecttafel zitten rechts en worden dus met de rechterhand bediend. Daardoor komt men er allicht toe om de schroeven voor de instelling van het mikroskoop, die zich in de nabijheid bevinden, eveneens met de rechterhand te bewegen. In dat geval is de linkerhand volledig ter beschikking van den linkernaaldhouder; ze kan er rustig naast liggen en behoeft geen ander werk te verrichten. Men doet dus in 't algemeen verstandig, als men de moeilijkste micromanipulaties met de linkerhand verricht (bij de beschrijving van de techniek zullen wij hiervan verschillende gevallen behandelen) en dus alleen de grove punt (No. 5) en het pincet aan den rechterkant instelt.

C. De dekglasjes.

De toebereiding der dekglasjes is een zóó gewichtig punt, dat wij er een afzonderlijk hoofdstuk aan wijden.

Mijn ervaring is, dat de micromanipulator, inzonderheid voor het fijnste werk, alleen door hen met succes kan worden gebruikt, die op dit punt niet te spoedig tevreden zijn. In hoofdzaak volg ik nog steeds de methode, die ik in 1899 en 1901 aangaf, en wel op dezelfde gronden, die ik toen heb uiteengezet. Men gebruikt het formaat 18×18 mm en neemt ze vooral niet dikker dan 0,2 mm, daar men met de sterkste immersielens op den onderkant van hangende druppels moet kunnen instellen. De hangende druppels mogen niet uitvloeien of samenvloeien; ze moeten, evenals de condensatiedruppels, die zich tegen het dekglas afzetten, min of meer convex zijn en scherp begrensd, zoodat de omtrek als een duidelijke lijn te zien is. Men verkrijgt dit door de glasjes „vettig” te maken.

De kwaliteit der dekglasjes is van groote beteekenis. Reeds wanneer ze een begin van verweering toonen (onder het microscop te herkennen als kleine krasjes, een beeld dat echter ook het gevolg van onzuiverheid kan zijn), zijn ze voor eenvoudige proeven met grootere cellen minder bruikbaar en voor moeilijke toepassingen met bacteriën geheel ongeschikt. Ook moeten ze volkomen schoon zijn. Men neemt dus glasjes, die betrekkelijk

nieuw zijn en kookt ze 10 minuten uit in een oplossing van 5% zuivere zeep, waarin men ze stuk voor stuk geworpen heeft, waarna men ze weer een voor een afspoelt in heet water (b.v. onder de straal van een geiser), om ze tenslotte in alcohol te bewaren. Droog bewaard verweeren ze.

De wijze van invetting is lang niet onverschillig. Aanvankelijk gebruikte ik, al is dit dan geen vet, vaseline; later varkensvet, dat ik zelf uitsmolt (dus niet de gezouten reuzel van den handel) en dat mij wel beter beviel. Toch had ik bij dit laatste, nu eens meer, dan eens minder, last van uitvloeien der druppeltjes, vooral bij hooge zomertemperatuur en als het preparaat wat lang dienst moest doen. Daarna ontdekte ik, dat hard niervet van het varken, nog bedekt door het peritoneum, dikwijls mooie resultaten gaf. Ik schreef dit toe aan de mogelijkheid, dat zich aan den buitenkant van het peritoneum, waarover dan het glaasje werd gestreken, alleen de vaste vetzure glycerine-esters zouden bevinden (tristearine, enz.), terwijl de vloeibare trioleïne, tezamen met deze vaste bestanddeelen, het inwendige zouden vormen. Ook vond ik, dat het vet van de urethra, die aan de gedroogde varkensblazen van den handel vastzit, dikwijls heel goede resultaten gaf, misschien wel door een lager gehalte aan trioleïne. Daar de vastheid van het vet echter sterk afhangt van het jaargetijde en 's winters het best is, gaf mij dit alles, vooral in den zomer, toch dikwijls minder mooie resultaten. Ik heb daarna ook proeven genomen met geharde vetten, waarvan enkele mij werkelijk dichter bij mijn doel brachten. Tenslotte heb ik dit bereikt door de trioleïne te elimineeren en dus te zoeken onder verschillende vaste vetzure glycerine-esters, zooals die in zuiveren toestand zijn te verkrijgen. Terwijl b.v. tripalmitine, tristearine en trimyristicine totaal onbruikbaar bleken, daar de condensatiedruppeltjes (deze, en niet de groote, met de gewone entnaald afgezette druppels vormden voor mij het criterium) vlak en grillig gevormd waren, gaf trilaurine alles wat men kan wenschen: kleine, bolle druppeltjes, op vrij grooten afstand van elkander en niet vervloeiend ¹⁾, terwijl geïsoleerde druppels gemakkelijk met de isoleernaald over het dekglas kunnen worden

¹⁾ Een goed beslag ziet men in Fig. 13. In Fig. 14 staan de druppels wat te dicht op elkaar. De microfoto's met minder fraai beslag zijn gemaakt, toen ik nog met niervet werkte; ik vond 't niet noodig ze alleen daarom te vervangen door nieuwe. Een vergelijking is bovendien leerzaam.

verplaatst. Merkwaardig is zeker het zeer uiteenlopende gedrag (ik had dit ook reeds bij geharde vetten ontdekt) van zoo na aan elkander verwante lichamen. De oorzaak kan gelegen zijn in het feit, dat trilaurine, in tegenstelling met de 3 andere stoffen, betrekkelijk gemakkelijk in zuiveren toestand wordt verkregen; overigens kunnen hier ook onbekende factoren van physisch-chemischen aard van invloed zijn. Ik zelf heb altijd gewerkt met trilaurine, in het laboratorium van Prof. S c h o o r l (wien ik hier mijn hartelijken dank breng voor zijn hulpvaardigheid) bereid door herhaalde omkristallisatie in alcohol uit Tangkallakvet, dat gewonnen wordt uit *Cylicodaphne sebifera* Bl. (O.-Indië), voor de bereiding van kaarsen en zeep gebruikt wordt en voor 85% uit trilaurine bestaat. ¹⁾ De trilaurine moet zuiver zijn, wat met het product uit den handel niet altijd 't geval is.

Het prepareeren van het dekglasje geschiedt aldus:

Men legt het glaasje, met een zwart papiertje er onder, op een vlakke, eenigszins elastische onderlaag (b.v. een blocnote), brengt er *uiterst* weinig trilaurine op (hoogstens de hoeveelheid van een speldeknopje) en wrijft deze een paar minuten lang goed uit over de geheele oppervlakte. Daartoe leent zich uitstekend een zeemleeren doezelaar, waarvan men de punt, ter lengte van een paar mm, recht heeft afgesneden. Daarna wordt, nadat — zoo noodig — grootere trilaurinedeeltjes zijn verwijderd, nog eens goed nagewreven met een tusschen vinger en duim gehouden zacht linnen lapje, dat geen vezels meer afgeeft, b.v. een stuk van een versleten zakdoek. Om de nadeelige werking van vochtige vingers uit te sluiten, wordt dit eenige malen dubbel gevouwen, zoodat men aan weerszijden van het glaasje 6 lagen heeft; in dezen vorm wordt het bewaard, terwijl er voor gezorgd wordt, dat bij het uitwrijven steeds dezelfde helft met de onderzijde van het glaasje in aanraking komt. Na het uitwrijven mag er geen korreltje meer op het glaasje te zien zijn en ziet dit er minimaal blauw, dus weer bijna gewoon helder, uit. Toch kan men, na het flambeeren, onder het microscoop nog wel eens een gesmolten korreltje aantreffen; een dergelijke plek gebruikt men niet. Het aldus toebeide glaasje wordt dan, met den geprepareerden kant naar onderen gekeerd, drie maal door den top van

¹⁾ Zie over T. o.a. S a c k, Pharm. Weekbl. 1903, bl. 4.

de ± 8 cm hoge vlam van een Bunsenschen brander gehaald, waarvan de luchttoevoer zoo is geregeld, dat ze niet-lichtend, maar toch nog met een smalle gele zoom brandt. Dit flam-beeren is een voorname factor. Is de vlam te heet, dan verbrandt de trilaurine; is ze te koud, dan is het opgebrachte laagje niet homogeen en het glaasje misschien niet steriel. De juiste wijze kan men alleen door ervaring leeren kennen. Wat de steriliteit der glaasjes betreft, kan ik intusschen mededeelen, dat ik bij de duizende glaasjes, die door mijn vingers zijn gegaan, nooit één geval van infectie, waardoor dan ook, heb geconstateerd.

Merkwaardig is het, dat soms, ook na lange ervaring, zich minder goede resultaten kunnen vertoonen. Als mogelijke oorzaak noem ik, behalve de zoo juist genoemde factor van het flambeeren:

- 1e. te hoge kamertemperatuur in den zomer, waardoor het dekglasje te warm is en de condensatiedruppels en geïsoleerde druppels te vlak en daardoor onduidelijk begrensd zijn. Dit laatste kan ook het gevolg zijn van:
- 2e. te geringe verdamping, indien de op het glaasje afgezette druppels bijna alle vast (gelatine of agar) zijn. In dat geval zet men nog een druppel phys.NaCl op het glaasje er bij, of legt men met een fijn druppelbuisje een klein druppeltje op den bodem van de isoleerkamer, tegen den voor- of achterwand aan (niet in het midden!);
- 3e. een te lang gebruikt wrijfapje. Men vernieuwe dit dus van tijd tot tijd, maar houde er rekening mede, dat een ongebruikt lapje gemakkelijker trilaurine opneemt dan een gebruikt en men dan dus iets meer er van op het glaasje moet nemen.

Ten slotte meen ik opgemerkt te hebben, dat de kans op een goed preparaat minder is als de glaasjes lang van te voren geprepareerd zijn.

In een overigens goed geslaagd preparaat vindt men de mooiste gedeelten, dus met scherp begrensde bolle condensatiedruppels, in den omtrek van de op het dekglas afgezette vloeibare druppels. Daar kleine partikeltjes het best te zien zijn in bolle druppels (lenswerking!), kieze men zulke gedeelten van het dek-

glas uit, als 't gaat om de isolatie b.v. van M u c h'sche lichaampjes en dgl. Minder mooie gedeelten late men ongebruikt.

Wat den invloed der broedstooftemperatuur betreft, wijs ik er op, dat bij lagere temperaturen (b.v. tot 25°) de preparaten veel langer goed blijven dan bij hoogere (37°). Toch heb ik er gezien, die na 2 maanden 25° , en andere, die na een maand bij 37° nog in redelijken toestand verkeerden. Verder houde men er rekening mede, dat bij hoogere temperaturen de druppels eerder neiging vertoonen tot vervloeien; daarom gebruikt men in dat geval, als 't kan, liever gelatine- of agarhoudend materiaal.

D. De hulpparaten.

1. De prepareerkamer.

Bij het afzetten van de druppels op het dekglasje moet dit goed vast liggen en luchtinfectie en verdamping zijn uitgesloten. Een dekglaspincet is hier dus niet gewenscht. Hiervoor dient de prepareerkamer (Fig. 5). Deze bestaat uit een koper tafeltje (a) van $2\frac{1}{2} \times 5\frac{1}{2}$ cm, in het midden voorzien van een opening van 14×14 mm en rustende op twee kolommen, die in een ijzeren voetstuk zijn bevestigd. De randen van de opening voorziet men van vaseline. Te veel is hier verkeerd; men legt er een weinig op en verspreidt dit gelijkmatig met een dikke verwarmde naald. Dan kan men het dekglas er op leggen. Ter afsluiting aan de onderzijde diende oorspronkelijk een objectglas met holle ingeslepen kom, dat met vaseline werd vastgekleefd. Wanneer men dan echter een glaasje behandelt, waarop reeds bacteriën in microscopisch kleine druppels geïsoleerd zijn, verdampen deze onder de bewerking. Daarom bevindt zich aan de onderzijde een vierkant kamertje met glazen bodem, waarvan de voorkant kan worden weggenomen. De zijwanden en de achterwand zijn met filtreerpapier bekleed; als men dit met water drenkt (om niet te veel waterdamp te hebben, is het beter dat men op den bodem geen water brengt), heeft men een ruimte, die zeer vochtig blijft, óók als men den voorkant even wegneemt. Deze wordt ook hier met vaseline vastgekleefd.

Het tafeltje a kan van de kolommen worden genomen en onder het microscoop worden gezien; dit is gemakkelijk als men een geprepareerd dekglasje even wil controleeren.

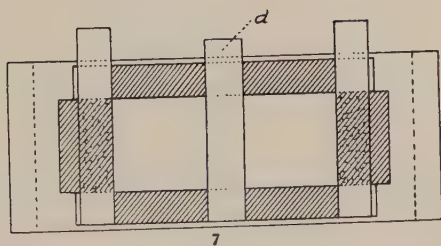
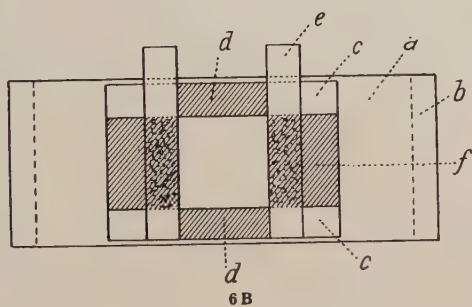
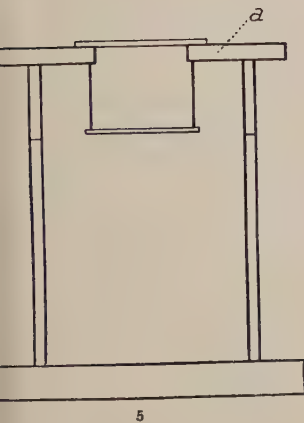
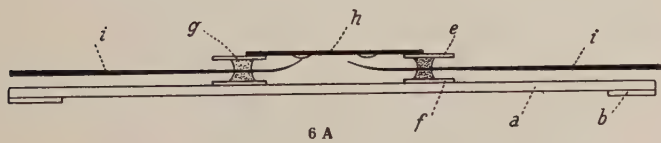
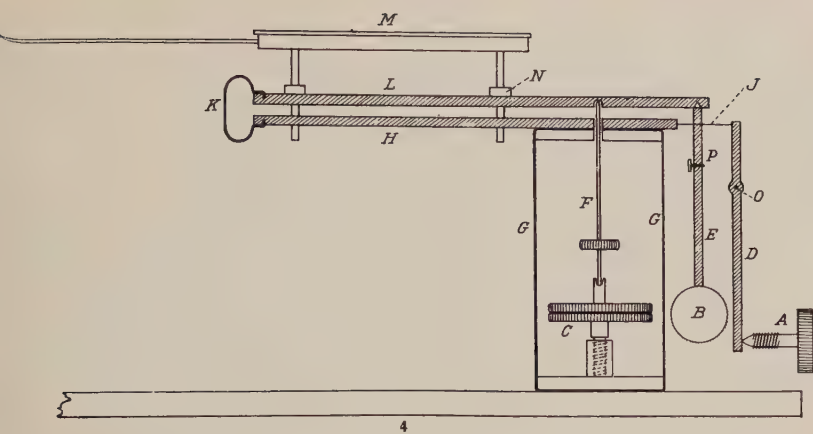
Men gebruikt de prepareerkamer ook als men uit een kolonie,

die zich op het dekglasma heeft ontwikkeld, wil overenten in een cultuurbuisje. (Zie pag. 236.)

2. *De isoleerkamer.*

Deze moet m.i. aan twee eischen voldoen: ze moet gedurende het gebruik *volkomen gesloten blijven*, zoodat zelfs de kleinste druppeltjes niet verdampen en ze moet zoo laag mogelijk zijn, zoodat het aanschaffen van een bijzonderen condensor niet bepaald noodig is.

Een objectglas a (Fig. 6A $2 \times$ vergroot, op lengtedoorsnede; Fig. 6B natuurlijke grootte, van boven gezien) van 65×26 mm rust, om het gemakkelijk in de bewegelijke objecttafel te vatten en te doen glijden, op twee glasstrookjes b. Aan de bovenzijde zijn, parallel aan elkaar en 14 mm van elkaar verwijderd, twee strookjes matglas c gekit van 5×35 mm en 3 mm hoog; op beide strookjes is in het midden een stukje mica d gekit van 5×14 mm. Aan weerszijden van deze stukjes mica brengt men wat vaseline; daarop kan men nu, als brug, aan weerszijden een strookje mica e van 5×30 mm vastleggen. Onder de bruggen is op het objectglas nog een micaplaatje f aangebracht. Daardoor ontstaat links en rechts een spleet van 14 mm lang en bijna 3 mm hoog. Nadat men de naalden i in het apparaat heeft gezet, en daarna de micabridgen op hun plaats heeft gelegd, worden deze spleten met een neutrale vloeistof g, n.l. aangedikte paraffine-olie, die men met een spatel aanbrengt, afgesloten. Men bereidt deze „afsluit-olie” door 10 cc paraff.liq. en $2\frac{1}{2}$ —3 g vaseline — al naar gelang van de vastheid der vaseline en het jaargetijde — op een warmwaterbad te mengen. Het mengsel moet homogeen zijn en niet te dik, daar anders de naalden in hun bewegingen worden belemmerd. Men let er op of de olie niet terugvloeit, waardoor er een opening ontstaat, die aanleiding is tot verdampen der druppels, zoowel in het isoleeroog als tegen het dekglas. Men bemerkt dit wel vrij spoedig; in kleine druppels geïsoleerde cellen zouden er nadeel van kunnen ondervinden. Dat de naalden dicht bij het vrije uiteinde in olie rusten, heeft dit belangrijk voordeel, dat de trillingen worden gedempt. Inwendig wordt de kamer met een watpropje, even in dezelfde afsluitolie gedoopt, ingewreven, zoodat opvallende luchtkiemen worden vastgehouden. De zijkanten en de bruggen, waarop het dek-



Pl. 2 (Fig. 4—7).

glaasje h komt te rusten, worden van vaseline voorzien, zooals dit bij de prepareerkamer is beschreven.

De isoleerkamer wordt bewogen door middel van een bewegelijke objecttafel. Hiervan zijn verschillende systemen in den handel, die de schroef, waarmee het preparaat van links naar rechts wordt bewogen, aan de rechterzijde, ongeveer tegenover het midden van de objecttafel hebben, maar die hier onbruikbaar zijn, omdat deze schroef dan in conflict komt met den naaldhouder. Men moet dus een systeem nemen, waarbij die schroef dicht bij de kolom van het microscoop geplaatst is, dus dicht bij den waarnemer. Als zoodanig kan worden aanbevolen o.a. een afneembare bewegelijke tafel van Leitz (b.v. katal. 51 no. 37 of 39). De linker afneembare schroef gebruikt men alleen als men de bewegelijke objecttafel langen tijd met de linkerhand bewegen moet. Een systeem, waarbij de klemmen, die het objectglas zijdelings vasthouden, zoo hoog zijn, dat ze de isoleernaalden raken, is natuurlijk ook niet bruikbaar. Deze klemmen moeten plat op de tafel van het microscoop rusten.

Op den duur vloeit er wat afsluitolie van de spleet in de kamer, ook daar, waar de bruggen rusten. Daardoor zouden deze laatste, en het dekglasje, minder vast komen te liggen. Af en toe maakt men de isoleerkamer dus schoon met pincet en watprop en voorziet ze, zoo noodig, daarna opnieuw van vaseline. Men zorg er voor, dat de zijspleten voldoende zijn afgesloten, zonder dat zij geheel, over de volle breedte, gevuld zijn. Daardoor voorkomt men onnoodig morsen en ook heeft men er dan geen last van dat de olie, als men het dekglasje wegneemt, bij het naar binnen zuigen op het dekglasje bij het preparaat komt. Dit afnemen geschiedt het best aldus: met naald of pincet houdt men het glaasje aan den linkerkant tegen en dan schuift men onder den rechterkant de pincetpunt (een scherp- en platpuntig pincet is noodig bij dit werk!), vóór men het glaasje opbeurt, heen en weer om eerst een opening te maken, waardoor de lucht toetreedt.

Van groot nut is de *dubbele isoleerkamer* (Fig. 7). Dikwijls komt het voor, dat men in een preparaat na eenigen tijd een zich ontwikkelend microörganisme vindt (bacteriën-cultuur of mycelium), dat men in een verschen cultuurdruppel zou willen overbrengen. Het glaasje zelf is bijna geheel bezet, zoodat er voor dien nieuwen druppel nauwelijks plaats is; bovendien werkt men

nooit zoo gemakkelijk op een glaasje, dat al eenige dagen oud is, hoe goed geconserveerd het er uit moge zien. Men legt dan het preparaat op de eene kamer en het nieuwe glaasje met de versche druppels op de andere. Met de oogvormige isoleernaald of de puntige (de laatste als het een jong mycelium betreft, waarin het oog zou kunnen verward raken, of een hyphe; deze laatste wordt eerst opgevouwen) bewerkt men het transport, zorg dragende, dat de naald zoo diep mogelijk naar beneden is gedraaid, zoodat de onderzijde van de tusschenliggende brug a niet wordt geraakt. Men zorgt er voor, dat deze van onderen glad en schoon is.

3. *De vochtige kamers.*

Daarvoor heb ik steeds den vierkanten vorm gebruikt; bij een ring verliest men ruimte aan de hoeken. Bij de tot dusverre gebruikte kamers was de binnenruimte geheel afgesloten en moest er dus in de broedstoof een soms aanzienlijke verhooging van dampspanning ontstaan. Dat deze schadelijk kan zijn voor de microörganismen is reeds geruimen tijd geleden betoogd door Clark ¹⁾, die daarom voorstelt de vochtige kamer, wanneer die in de broedstoof wordt gezet, niet geheel met het dekglas te bedekken, maar een spleetje open te laten, dat eerst later wordt gesloten. Hiervoor moet men echter allicht de vochtige kamer uit de stoof halen, waarbij ze snel afkoelt, zoodat ze daarna in gesloten toestand toch weer warmer wordt; ook blijft het altijd de vraag hoe lang men dat spleetje open kan laten, zonder dat de druppels gevaar loopen van in te dampen. Deze methode is dus onzeker. Bij vermeerderde dampspanning ziet men nog een ander onaangenaam gevolg: het dekglasje wordt opgebeurd, zóó dat de gevormde opening blijft bestaan en men vindt de druppels geheel ingedroogd, of men vindt het dekglasje geheel verschoven.

Een zeer eenvoudige vochtige kamer, die deze onaangename verrassingen niet vertoont en volkomen isobarometrisch is, bestaat uit een vierkant raampje van vernikkeld koper met inwendige ruimte van 14×14 mm, terwijl breedte en hoogte van den rand resp. 4 en 3,5 mm bedragen; het is met een goede kit ²⁾

¹⁾ Clark, On the toxic effect etc. Bot. Gazette 1899 p. 289.

²⁾ Als zoodanig kan ik aanbevelen „Pebe”kit no. 3, verkrijgbaar in den Instrumentenhandel Marius, Utrecht.

bevestigd op een zoo dik objectglas, dat dit niet kan doorbuigen, waardoor de kit zou barsten. De rechter zijwand is aan den onderkant in het midden aan weerszijden half rond ingeboord. De daardoor ontstane verdiepingen a zijn door een fijn gleufje b verbonden (Fig. 8A, natuurlijke grootte, van onder gezien; Fig. 8B $2 \times$ vergroot, doorsnede volgens stippellijn), zoodat de binnenruimte met de buitenlucht in verbinding staat. Vóór men het kamertje afsluit met het dekglas, brengt men in de holte aan den binnenkant een druppeltje paraff.liq. Bij verhooging van dampspanning ziet men luchtbelletjes aan den buitenkant ontwijken; bij vermindering aan den binnenkant; het gleufje blijft door de vloeistof gesloten. Wordt de vochtige kamer bij langdurig gebruik herhaaldelijk uit de stoof gehaald, dan is het gewenscht af en toe het ventiel te controleren. Want door het veelvuldig inzuigen en uitpersen kan de vloeistof tenslotte zoo ver uitvloeien, dat ze de spleet niet meer afsluit. Men vult dan voor alle zekerheid aan den buitenkant wat bij. Overigens kan het uitvloeien vrijwel worden voorkomen door een draadje naaigaren, $\frac{1}{2}$ mm dik en 5 mm lang, in het gleufje te schuiven; dit houdt de vloeistof bijeen.

De afsluiting tusschen dekglas en raampje geschiedt niet met gewone vaseline, daar deze in de broedstoof van 37° vloeibaar wordt en het dekglasje daardoor van zijn plaats kan glijden. Men sluit daarom af met verdikte vaseline (20 dln. vaseline + 1 dl. paraffinum solidum). Van binnen worden de kamers met afsluitolie ingewreven, op dezelfde wijze als bij de isoleerkamer.

Vóór men de vochtige kamer met het dekglas afsluit, ademt men op den bodem (voorschrift van B a r b e r); dit waarborgt terstond een met damp verzadigde ruimte, zoodat de kultuurdruppels niet kunnen indampen. Bestaat er grond om te vermoeden, dat het CO_2 -gehalte der ademlucht op de P_H der cultuurdruppels zal inwerken, dan zet men 2 uiterst kleine druppeltjes af tegen de zijwanden van de vochtige kamer, tegenover elkaar. Een grootere druppel, op den bodem aangebracht, geeft vooral bij hooge broedstooftemperaturen hinderlijke condensatie, met vervloeien der druppels, op het dekglas boven dien druppel.

Men legt de vochtige kamer liefst beschermd (b.v. in een halfgeopend doosje) in de broedstoof.

Het dekglasje zit soms zeer vast op het raampje gekleefd; bij anaërobe vochtige kamers wordt het bovendien nog naar

binnen gezogen. Dan kan het opbeuren met een scherppuntige pincet het barsten van het glaasje tengevolge hebben. Daarom gebruikt men daarvoor (ook, desgewenscht, bij het werken met prepareer- en isoleerkamer) beter een stukje van een Gillette-mesje, in een houder gevat, ter breedte van $1\frac{1}{2}$ cm. Men schuift dit in zijn volle breedte onder het glaasje.

4. *De entnaalden voor macroscopische enting.*

In den loop der jaren ontstond gaandeweg behoefte aan allerlei entnaalden, ook van anderen vorm dan de gewone oognaald en rechte naald. Hieronder volgt de beschrijving van enkele.

- a. De naald, waarmede druppels op het dekglas worden afgezet, is van 0,5 mm draaddikte en omgebogen in een oog, waarvan het lumen ook 0,5 mm bedraagt. Hiermede kan men achter elkaar 2 druppels afzetten, die niet te groot zijn. Neemt men dikker platinadraad, b.v. 0,6 mm, dan worden de druppels te groot. Niettegenstaande het gedurig uitgloeien blijven er doorgaans vuurvaste bestanddeelen op zitten, die men van tijd tot tijd langs mechanischen of chemischen weg dient te verwijderen.

Sommige druppels vloeien bij het afzetten meer uit dan andere. Van phys.NaCl zijn ze betrekkelijk bol; van bouillon zijn ze meer uitgevloeid. De druppel, die het eerst wordt afgezet, is altijd het grootst; wil men die, b.v. van bouillon, niet op het glaasje hebben, dan kan men die afzetten in het buisje, waaruit men het materiaal neemt.

De draad heeft de gewone lengte van 5—6 cm en kan in een glasstaaf zijn ingesmolten. Het langer warm blijven van een dikken draad is van voordeel bij het afzetten van gelatine-druppels. Agar-houdend materiaal is echter, op gelijke wijze overgebracht, reeds vast geworden vóór men het glaasje heeft bereikt. Daarom kan men daarvoor gebruiken:

- b. een oog van denzelfden vorm als a, maar met een draad van 1,5 cm en gevat in de bekende metalen staaf met schroef-dopje. Na het flambeeren, óók van het uiteinde van de metalen staaf, blijft het oog veel langer warm. De juiste graad van verwarming moet door oefening gevonden worden. Toch blijft dit een onzekere methode. Betere resultaten (hoewel de rand van agar-houdende druppels altijd uitvloeit en daardoor onduidelijk en min of meer droog is) bereikt men met:

- c. een entnaald, die op constante temperatuur wordt gehouden (Fig. 9). Twee evenwijdige koperen draden van ruim 1 mm in diam. en 20 cm lang, zijn gevat in een ebonieten handvat. Ze worden door glazen beugeltjes op 2 mm afstand van elkaar gehouden en dragen aan het uiteinde een platina-lus, die in een oog van de onder a beschreven afmeting eindigt. Men laat er den stroom van den microcauter doorgaan en regelt dezen zoo, dat een druppel bouillon-agar van $\pm 40^\circ$ nog vloeibaar op het dekglas kan worden afgezet.

Wil men uit een jonge kolonie of cultuur, die op het isoleerglaasje in een druppel is ontstaan, overenten in een cultuur-buisje, dan kan men daarvoor een der drie volgende naalden gebruiken:

- d. een fijne oogvormige naald met een draaddikte van 0,3—0,35 mm en een lumen van 0,5 mm.
 e. een naald met een over 1—2 mm lengte omgebogen, scherp geslepen punt; draaddikte 0,6 mm.
 f. een rechte naald (dik 0,6 mm), omwoeld met een platina-draad van 0,1 mm, zóó, dat het vrije uiteinde in een boog boven den dikken draad uitsteekt (Fig. 10).

Deze naald is onmisbaar bij het overbrengen van een mycelium uit cultuurdruppel in kweekbuisje.

- g. een schoffelnaald, om dikke gelatine-druppels van het glaasje te scheppen (zie pag. 237 en 274). Een stukje platinablik, dik 0,5 mm, lang 40 mm, van onderen 6 mm en van boven 3 mm breed, wordt met het breede onderende in den glasdraad ingesmolten. Daarna wordt de bovenrand schuin geslepen op zeer fijn amarilpapier en daarna het bovendende over 2 mm omgebogen (Fig. 11; bij a bovengedeelte vergroot op doorsn.).

5. *Lichtbron.*

Bij den micromanipulator hoort een krachtige lichtbron, met uitschakeling van de chemisch werkzame stralen. Daar dit met diffuus daglicht niet te bereiken is, neemt men kunstlicht. Dit kan tot voldoende sterkte worden opgevoerd en is bovendien van constante intensiteit. Uitstekend is gasgloeilicht; ook de elektrische gloeilamp (b.v. van 100 k. of meer) is goed te gebruiken.

Tusschen lichtbron en microscoop plaatst men den bekenden glazen bol, gevuld met een niet te donkere oplossing van kaliumbichromaat (op een bol van $3\frac{1}{2}$ l is 1 g. voldoende). Hierdoor worden de chemisch werkzame stralen en zeker ook een groot deel van de warmtestralen geabsorbeerd; bij gasgloeilicht kan men bovendien nog een lampegas van euphosglas gebruiken. Wie het gele licht onaangenaam mocht vinden (men gewent er spoedig aan en gaat het dan waardeeren), kan bovendien een kobaltglaasje op de iris leggen.

Aan het houten montuur, waarin de bol is gevat, kan men zijdelings een spiegeltje bevestigen en dit zoo richten, dat men onder het microscopiseeren den afstand van objectief tot dekgas kan waarnemen. Dit geeft bij het veelvuldig wisselen der objectieven gemak en veiligheid.

Ik mag deze beschrijving van den micromanipulator en zijn hulpapparaten niet eindigen zonder er op te wijzen, dat de schroeven van het microscoop glad moeten loopen; dat de bewegelijke objecttafel vlak moet rusten op de objecttafel van het microscoop en toch gemakkelijk in alle richtingen daarover moet kunnen glijden; dat de revolver (slede-objectieven zijn hier anders ook zoo kwaad niet!) goed moet zijn gecentreerd en dat, mocht dit niet het geval zijn, de afwijkingen goed moeten worden onthouden. Men houdt den micromanipulator, wanneer er niet mede gewerkt wordt, ook toegedekt; inzonderheid de isoleeren de prepareerkamer, daar opgevallen vaste deeltjes oorzaak kunnen zijn, dat de vaselinelaag niet afsluit.

HOOFDSTUK II.

Isoleeren en microöperatie's.

A. *Voorbereidend werk.*

Het dekglasje, geprepareerd op de hierboven aangegeven wijze, wordt na het flambeeren op de prepareerkamer gelegd. Nadat het is afgekoeld worden de druppels, waarin gewerkt zal worden, aangebracht. Men kan dit in verschillende combinaties doen. Wij zullen er een aangeven, die voor het gewone isoleeren nogal praktisch is en is voorgesteld in Fig. 12. Hierin zijn 1—3 druppels phys.NaCl-opl. en 4—9 van den voedingsbodem, waarin de reincultuur moet ontstaan. De NaCl-oplossing (0,8% op leidingwater) houdt men in buisjes van inwendig goed uitgestoomd Jena-glas. Gewone cultuurbuisjes geven n.l. aan de vloeistof glasbestanddeelen af, die zich verzamelen in een dun vliesje, dat bij opvallend sterk licht aan de oppervlakte te zien is. Het entoog neemt altijd wat van dat vliesje mee en de afgezette druppels zijn dan niet geheel helder.

Wij stellen eens voor al vast dat, macroscopisch gezien, de volgorde der druppels is als in de figuur; microscopisch telt men dus van links naar rechts en elke rij van boven naar onder. De buitenste druppels mogen nooit te dicht bij den zijwand van de vochtige kamer liggen. Men zorgt dus dat de diam. liefst niet meer dan 1,5 mm bedraagt en dat er aan alle kanten een vrije zône van 2 mm blijft; daarbuiten is dan nog een strook van 2 mm (in de fig. gearceerd), waarmede het dekglas op de vochtige kamer rust. Men voorkomt zodoende contactinfectie met de voor afsluiting dienende vaseline, terwijl mycelia nog gelegenheid hebben om iets buiten den druppel te groeien.

Men kan de druppels 't beste regelmatig afzetten als men de prepareerkamer aan den rand van de tafel zet, de naald

met beide handen, die men tegen het onderlijf laat rusten, vasthoudt en, ingeval van 9 druppels, met de middelste begint. Een regelmatige rangschikking van de druppels in rechte lijnen is vooral van nut als men met sterke vergrooting werkt; men kan dan n.l., ook zonder herhaaldelijk om te wisselen met de zwakke vergrooting, door horizontale of verticale verschuiving van de bewegelijke objecttafel, den weg van den eenen druppel naar den anderen vinden.

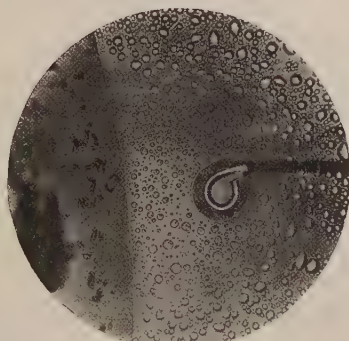
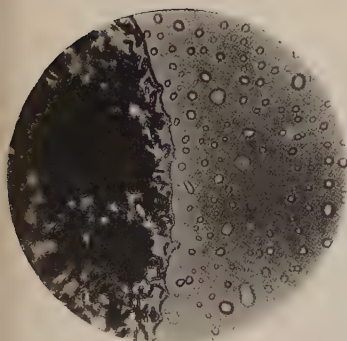
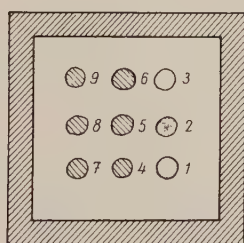
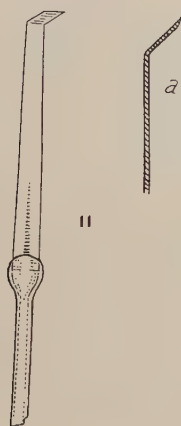
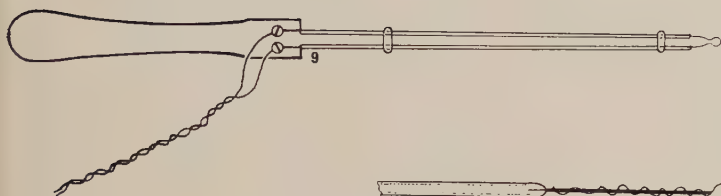
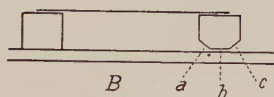
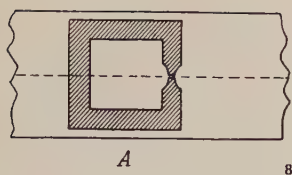
In het midden van druppel 2 brengt men met een gewone entnaald het materiaal, waaruit zal worden geïsoleerd. 't Is niet noodig eerst naar een juiste verdunning te zoeken; 't preparaat is het best, als de druppel niet geheel gevuld is, maar in 't midden veel, aan den rand weinig cellen bevat. Dezen druppel noemen wij voortaan „materiaaldruppel”; 1 en 3 zijn „spoeldruppels”, 4—9 „cultuurdruppels”.

Op dezelfde wijze kan men, slechts met wat meer voorzichtigheid, 16 druppels in 4 rijen afzetten.

Is het dekglasje klaar, dan wordt de isoleerkamer in gereedheid gebracht (zie pag. 218) en in de bewegelijke objecttafel bevestigd. De schroeven A en B worden 3 mm van uit hun diepten stand teruggeschroefd en zoo in hun gemiddelden stand gezet. Daarna plaatst men het microscoop in 't midden tusschen de twee naaldstatieven.

Nu worden de naalden gesteriliseerd. Eerst dompelt men ze over een lengte van ongeveer 3 cm in petroleumaether, waardoor sporen van de afsluitolie, die van de vorige proef kunnen zijn achtergebleven en naar de punt gevloeid, worden verwijderd. Daarna houdt men de punt van de naald in sterk zwavelzuur. Men zet daartoe het wijdmondsche fleschje met zwavelzuur zoo, dat de oppervlakte der vloeistof weerspiegelt en zorgt dat deze juist even door de punt van de naald wordt aangeraakt. Daarna herhaalt men hetzelfde met ammonia (beide vloeistoffen chemisch zuiver!). Het spoortje ammoniumsulfaat, dat hierbij ontstaat, lost in de ammonia op; mochten zich enkele moleculen aan de naald hechten, dan verdwijnen die zeker in den spoeldruppel, waarin men later de punt nog dompelt. ¹⁾ De naaldhouders worden daarna in het toestel bevestigd en schroef C

¹⁾ De schadelijke werking van amm. sulf. is trouwens zeer gering. Reeds Miquel (Les organismes vivants dans l'atmosphère) vond dat niet minder dan 250 g op 1 L bouillon noodig is om de ontwikkeling tegen te gaan.



Pl. 3 (Fig. 8—14).

zoo ver omhoog gedraaid, dat de naald den onderkant van de spleet der isoleerkamer bijna raakt; daarna worden de bruggen op de spleten gelegd, waarna deze met afsluitolie worden gesloten. Ten slotte wordt het isoleerdekglasje op de kamer gelegd en voorzichtig aangedrukt.

Spoedig vertoont zich het gewenschte beeld van de condensatiedruppels. Bij zwakke vergrooting ziet men ze als zeer fijne puntjes; bij sterke vergrooting als in Fig. 13. Men verschuift bij zwakke vergrooting (steeds met het bloote oog controleerend!) het microscoop tot de linker naald in het gezichtsveld is en brengt het uiteinde daarvan in een der spoeldruppels; daarna beweegt men F (Fig. 4) snel op en neer om het af te spoelen. (Dit snelle indompelen is in het algemeen ook de manier om het uiteinde te bevrijden van aanklevende deeltjes.) Nu wordt de naald zoo gesteld, dat het uiteinde, wanneer 't het dekglas raakt, ook bij sterke vergrooting in het midden van het gezichtsveld komt. Sommigen hebben moeite om bij zwakke vergrooting dat punt precies te bepalen; ook is de revolver niet altijd volkomen zuiver gecentreerd. Er bestaat dan kans, dat men bij sterke vergrooting de naald niet ziet, terwijl men niet weet, in welke richting men die moet verplaatsen om ze in het gezichtsveld te krijgen. Daarom brengt men bij zwakke vergrooting den rand van den spoeldruppel in het midden en trekt men met de naald een klein druppeltje er uit, dat men vlak bij dien rand, ongeveer in het midden, laat liggen. Deze combinatie van rand en druppel is bij sterke vergrooting gemakkelijk terug te vinden; men zet dan, nog steeds bij sterke vergrooting, het druppeltje precies in het midden van het gezichtsveld, en verplaatst daarna bij zwakke vergrooting de naald, zoodat het uiteinde bij opwaartsche beweging in het druppeltje komt.

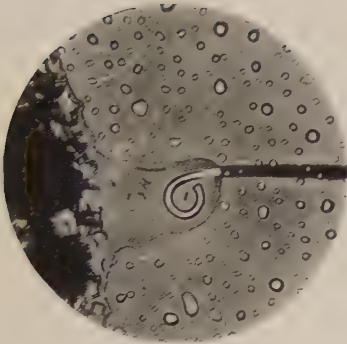
Wij zullen nu na deze algemeene beschouwing enkele bijzondere gevallen van isoleeren nader beschrijven. Wij zullen dit eenigszins uitvoerig doen, omdat de ervaring ons heeft geleerd, dat bij minder nauwkeurige voorlichting allerlei technische fouten begaan worden, die het werk kunnen doen mislukken. De beschrijving zal daardoor uiteraard zich minder leenen tot lectuur als zoodanig, dan wel tot een handleiding, die men bij het werk met den micromanipulator gedurig raadpleegt. Wij beginnen dan met het moeilijkste geval, omdat dit voor allerlei problemen toch nog altijd het beste is.

B. *Kleine organismen, met of zonder eigenbeweging en niet aan het glas klevend.*

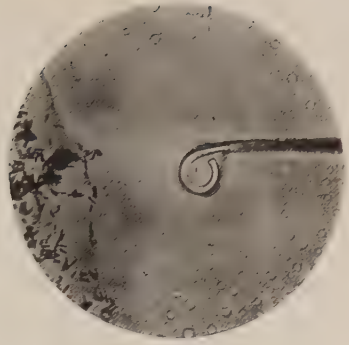
De fijne oognaald no. 1 wordt hiervoor in het linkerstatief bevestigd en (naar verkiezing; zie pag. 246) de grove puntnaald in het rechter. 't Eenvoudigste geval doet zich voor als men de bacterie, die men isoleeren wil, aan den rand van den druppel ziet, op een plaats waar zich niet veel andere cellen bevinden. Dat komt dikwijls bij bewegelijke aërobe bacteriën voor. Men brengt het oog (Fig. 14) tegen het dekglas, vlak bij den rand van den druppel ¹⁾ en drukt zijdelings tegen de micrometerschroef, totdat het juist den druppelrand raakt. Daardoor wordt een weinig vloeistof uit den druppel getrokken (Fig. 15). Ziet men dat de bacterie in kwestie is meegegaan, dan doet men den druk ophouden of oefent men dien in tegengestelde richting uit, waardoor de naald weer teruggaat en een klein druppeltje, met de bacterie er in, zich van den grooten druppel losmaakt. (Fig. 16.) (Niet alle cellen laten zich op deze wijze meetrekken. Bij sommige is het beter het oog achter de cel te zetten en deze zoo uit den druppel te schuiven.) Nu beweegt men de naald iets naar beneden (Fig. 17) om te constateeren, dat men niet meer dan die eene bacterie geïsoleerd heeft. ²⁾ Deze contrôle is mogelijk en *absoluut betrouwbaar, omdat het druppeltje zoo klein is*; was het grooter, dan zou men een kleine bacterie, die meegegaan was, zeer waarschijnlijk voorbij zien. Nog sterker geldt dit laatste als men met korreltjes (M u c h'sche granula en dergl.) experimenteert. Daarna spoelt men het oog af in den spoeldruppel, waardoor het tevens weer met vloeistof wordt gevuld. Als men het dan in den druppel met de geïsoleerde bacterie brengt, het daarin (door drukken tegen de micrometerschroef!) even heen en weer beweegt en tijdens die beweging weer naar beneden draait, blijft er een leeg druppel op het dekglas achter en blijkt de bacterie in het oog te zijn opgenomen. (Fig. 18.) Met een leeg of bijna leeg oog zou dit niet gelukken; dit neemt geen cellen op. Een gevuld oog doet dit wel; er ontstaat dan n.l., door het inbrengen van een zekere hoeveelheid vloeistof, eenige beweging in het druppeltje, waarin de geïsoleerde cel ligt,

¹⁾ Op korter afstand dan in de Fig.!

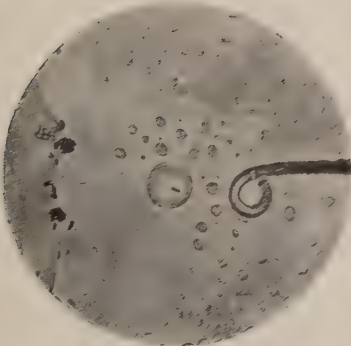
²⁾ In de Fig. is het oog daarna weer tegen het glas gebracht.



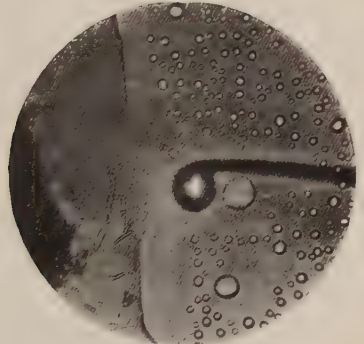
15



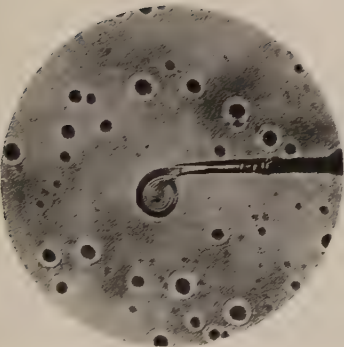
16



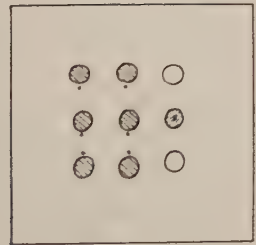
17



18



19



20

Pl. 4 (Fig. 15—20).

zoodat deze haar plaats bij het glas verlaat en in het oog komt te liggen. Bij bacteriën, die neiging vertoonen om aan het dekglas te kleven, moet men deze beweging wel eens herhalen. Soms moet men ze zeer snel uitvoeren door F (Fig. 4) iets op te beuren. Soms blijkt het wenschelijk de bewegelijke objecttafel te verschuiven; men plaatst het oog naast het druppeltje en beweegt de tafel in zijdelingsche richting. Meestal is echter de eerst-beschreven wijze doeltreffend. Dat de bacterie werkelijk in het oog van de naald zit, kan men (bijzonder fraai bij bewegelijke vormen) constateeren, als men het oog weer bijna tegen het dekglas brengt en scherp daarop instelt. Fig. 19 maakt dit duidelijk; men ziet de bacterie, rondzwemmend in het oog en de condensatiedruppels, waarop thans niet is ingesteld, omgeven door diffractie-ringetjes.

De bacterie moet nu in een der cultuurdruppels gebracht worden. Men stelt het oog iets lager en daarna verschuift men de isoleerkamer zoo ver naar rechts, dat het oog van de naald, wanneer dit dicht bij het dekglas gebracht wordt, vlak bij den bovenrand of den onderrand van een cultuurdruppel verschijnt. Fig. 20 geeft in schema met puntjes de plaats aan waar men de bacteriën kan afzetten; men kiest liever niet de randplaatsen, die dicht bij de vaseline-afsluiting liggen, daar dit bij het latere afenten van de kolonie niet gewenscht is; men neemt daarvoor ook niet den zijrand, omdat men dan de betrouwbare beweging van Fig. 24—26 niet kan uitvoeren. Bij sterke vergrooiting brengt men dan het oog tegen het dekglas. In Fig. 21 ziet men het naderen, in Fig. 22 heeft het den druppel afgezet, waarin zich de geïsoleerde bacterie bevindt. Is de bacterie in het oog achtergebleven, dan zet men een tweeden druppel af in de onmiddellijke nabijheid en eventueel een derde, alle langs den rand van den cultuurdruppel. Men kan n.l. uit een oog doorgaans 3 tot 4 druppels afzetten; soms gaat de bacterie eerst met den laatsten mee.

Sommige cellen willen — misschien door het bezit van lange ciliën — nog wel eens in het oog achterblijven, ook al ontledigt men dit geheel. Men kan ze er uit krijgen als men eerst, door combineeren van eenige druppeltjes, een iets grooteren druppel maakt en daar het oog in brengt; of ook, door het oog tegen het glas te brengen, langzaam te laten zakken, totdat men de bacterie tusschen oog en dekglas ziet (Fig. 23, van terzijde ge-

zien) en dan in zijdelingsche richting (drukken tegen micrometerschroef!) het oog geheel los te maken van het glas.

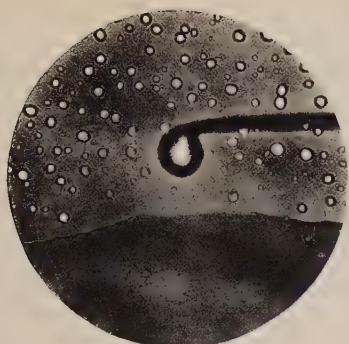
Op dezelfde wijze brengt men vijf andere bacteriën naast hun cultuurdruppels, indien men althans te doen heeft met bacteriën, die het licht goed verdragen (b.v. coli, typhus, cholera). Is dat niet het geval, of is men daar niet zeker van, dan isoleert men niet meer dan een of twee bacteriën op één dekglasje. Hoe het zij, 't laatstafgezette druppeltje laat men in 't midden van het gezichtsveld; de isoleerkamer wordt daarna dus niet meer verschoven.

Tenslotte moeten de bacteriën nog in de cultuurdruppels worden gebracht. Dit gebeurt met de grove puntnaald. Bij zwakke vergrooting draait men de oognaald zoover mogelijk omlaag en daarna de puntnaald omhoog, terwijl men het microscop verschuift, zoodat de punt in de laatst-afgezette druppel terecht moet komen. Met sterke vergrooting zet men de punt echter tusschen dat druppeltje en den cultuurdruppel. Door drukken tegen de micrometerschroef brengt men de punt in het druppeltje en voert men dit, met de bacterie, in den rand van den grooten druppel. (Fig. 24—26.) Bij deze beweging blijft men de bacterie zien, wat niet het geval zou zijn, als men er de oogvormige naald voor gebruikte. Dat men aldus de bacterie aan den uitersten rand van den druppel kan plaatsen, heeft b.v. bij experimenten betr. deeling zijn nut; ook geeft het zekerheid, dat één cel en niet meer dan die eene, op de plaats der bestemming is afgezet. Bij vloeibare cultuurdruppels drijft de bacterie altijd iets naar het midden af, intusschen niet zoo ver, of men kan ze voorloopig nog met de immersie-lens blijven zien.

Zijn de zes bacteriën in de cultuurdruppels geplaatst, dan kan men er, zonder dat men de naalden opnieuw steriliseert, nog meer isoleeren, wanneer men het dekglas op de isoleerkamer laat liggen tot men een tweede dekglas heeft gereed gemaakt.

Men zou kunnen meenen, dat vlug zwemmende bacteriën moeilijker in het oog zijn te vangen dan stil langs den rand liggende. Dat is niet het geval. Men plaatst eenvoudig het oog tegen het glas, vlak bij den druppelrand en wacht tot de bacterie daar passeert. Op dat moment drukt men even het oog tegen den rand en de bacterie is gevangen.

Wij hebben boven aangenomen, dat de rand van den materiaaldruppel niet al te dicht met bacteriën bezet was. Er kunnen



21



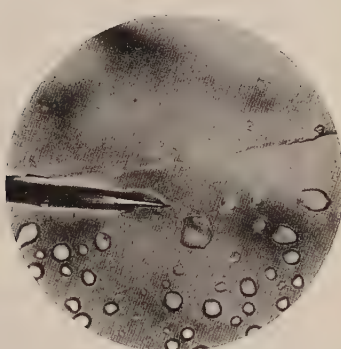
22



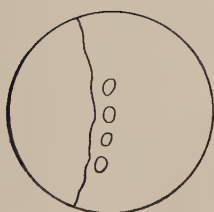
23



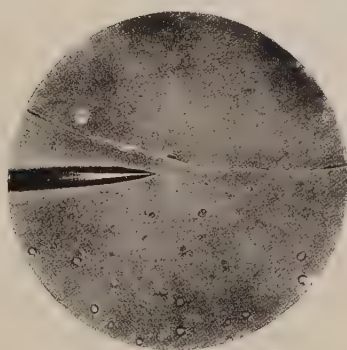
24



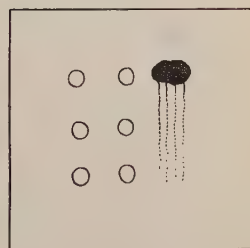
25



27



26



28

Pl. 5 (Fig. 21—28).

echter ook wel zooveel bacteriën langs den rand voorkomen, dat men er verscheidene in het druppeltje meetrekt. In dat geval brengt men het oog vlak langs den zijrand van een der spoel-druppels zoo dikwijls tegen het glas, dat de vloeistof in meerdere druppeltjes verdeeld wordt. (Fig. 27.) Dan spoelt men het oog uit en kan men er de gewenschte bacterie mede opnemen, als deze zich afzonderlijk in een der druppels bevindt. Bevindt ze zich met andere te zamen in een der druppels, dan is het soms noodig om dien weer te verdeelen.

Dikwijls bevinden de bacteriën, waaruit men isoleeren wil, zich niet aan den rand, maar in het midden van den druppel. Dan brengt men bij zwakke vergrooting het isoleeroog (liefst alleen het oog, zonder het daarachter volgende draadgedeelte) in het materiaal en ledigt men het in den spoeldruppel, dicht bij den rand of buiten den spoeldruppel in verschillende druppels langs den rand. Verder gaat men dan te werk zooals hierboven is aangegeven.

Grootere cellen, zooals gist en schimmelsporen, worden op dezelfde wijze als bacteriën geïsoleerd. Slechts zij er op gewezen, dat hierbij niet de olie-immersie noodig is bij het uitzoeken en isoleeren, wanneer het materiaal vrij zuiver, d.w.z. bacterie-vrij is. Alleen voor de laatste contrôle, dus onmiddellijk vóór het overbrengen in den kultuurdruppel, kan men dan de immersie gebruiken en daarbij tot nader onderzoek zoo noodig de cel met de puntnaald in het druppeltje eerst nog omwentelen.

Sommige schimmelsporen hebben, waarschijnlijk door hun groote adhaesie met glas, de eigenaardigheid om op te loopen tegen de naald, wanneer men die in loodrechte richting naar beneden uit den druppel haalt. Men kan ze kwijt raken door het preparaat vrij snel in zijdelingsche richting te bewegen.

Wil men, met schimmelsporen werkend, er zeker van zijn, dat het mycelium zich midden in den druppel ontwikkelt, dan zal men de sporen ook in 't midden moeten afzetten. Dit kan met het oog direct gebeuren en met de punt door ze er heen te duwen.

C. Kleine, langwerpige organismen, die aan het dekglas klevan.

Deze laten zich niet, of zeer moeilijk, in een oog opvangen. Men gebruikt hiervoor bij voorkeur de fijne puntnaald no. 4, die men tusschen de cel of hyphe en het glas schuift. Daar dit — tenzij men met langere hyphen te doen heeft — niet mogelijk

is, zoolang de cellen zich nog bevinden in een grooten druppel, moet het materiaal verspreid worden, zoodat een groot deel van de cellen geïsoleerd komt te liggen. Dit geschiedt aldus (Fig. 28): Ter plaatse van druppel 3 deponeert men het materiaal met zoo weinig mogelijk vloeistof, b.v. afgenomen van een agar-cultuur of uit een centrifugaat; 4—9 zijn cultuurdruppels. Als deze vast zijn, moet echter 5 een klein druppeltje phys.NaCl zijn, want er moet, om verzadigde waterdamp te geven, althans één vloeibaar druppeltje op het glaasje zitten. Nu kan men verder op twee manieren te werk gaan. Men kan, terwijl het glaasje zoo op de prepareerkamer ligt, met het fijne platina-entoog (p. 223) van uit het materiaalklontje strepen trekken en daarna het glaasje op de isoleerkamer leggen, om dan met de fijne puntnaald te isoleeren. Men heeft 't verspreiden van het materiaal echter meer in de hand en kan het beter controleeren, zoodat er minder kans is op beschadiging der cellen (b.v. afscheuren van ciliën), als men 't aldus doet.

Men zet in den rechter naaldhouder 't groote oog no. 3, links de fijne puntnaald. Bij zwakke vergrooting brengt men het oog in het materiaal, zonder dat het 't dekglas aanraakt (vgl. Fig. 23), waarna men de isoleerkamer in verticale richting beweegt, er voor zorg dragend, dat het materiaal het dekglas blijft aanraken. In beide gevallen krijgt men 3 of 4 evenwijdige strepen, waarin men cellen in grootere en kleinere hoeveelheden tegen elkaar aan, maar ook zeer vele geheel afzonderlijk ziet liggen. In dezelfde richting, waarin de beweging plaats had, liggen ook de meeste staafvormige cellen. Deze zijn omgeven door een zeer smal zoompje, deels van gecondenseerde waterdamp, deels van vocht van den materiaaldruppel. Ontbreekt dit zoompje, dan kan de naald de cellen beschadigen. 't Kost niet veel moeite de cellen met de puntnaald op te nemen. (Fig. 29 en 30.) Wil het soms niet best gelukken, dan zoekt men 2 bacteriën op, die tegen elkaar liggen, of men schuift er 2 naast elkaar; men kan dan de voorste op de punt nemen, omdat die door de achterste wordt tegengehouden. De fijnste beweging, dus het richten van de punt tusschen het midden van de bacterie en het glas, geschiedt hier weer door drukken tegen de micrometerschroef. Men zorge er echter voor, dat men niet met deze punt in een gelatinedruppel of in een klontje van bacteriën steekt, waarin het fijne uiteinde van minder dan $1\ \mu$ dikte gemakkelijk afbreekt.

Terwijl bacteriën, zoolang ze zich in een druppel bevinden, nogal turgescent schijnen, ziet men ze, als ze op de punt van de naald zitten, slap daaromheen vallen, hoewel de atmosfeer met waterdamp verzadigd is.

De opgenomen cellen kunnen zonder nadere contrôle terstond in den cultuurdruuppel afgezet worden; nauwkeurig werkend weet men zeker, dat men maar één cel heeft geïsoleerd. Is de cultuurdruuppel vloeibaar, dan wordt de cel eenvoudig afgespoeld. Is hij vast, dan brengt men bij zwakke vergrooting de punt tegen den onderkant aan, iets voorbij het laagste punt en beweegt men daarna het dekglas in de richting van de pijl. (Fig. 31a.) De cel wordt a.h.w. afgeveegd en men ziet, reeds bij zwakke vergrooting, het streepje, dat de punt heeft getrokken.

Na afloop is de schoone punt het bewijs, dat de cel op de plaats der bestemming is achtergebleven. Wil men een opgenomen bacterie tegen het glas afzetten, dan handelt men volgens Fig. 31b. Terwijl men de punt naar boven beweegt, beweegt men het dekglas in de richting van de pijl. Op deze wijze wordt de bacterie, zoodra ze door adhaesie aan het dekglas blijft hangen, zonder beschadiging van de punt afgeschoven.

Dat men op deze wijze alle langwerpige organismen, dus ook niet-aan-het-glas-klevende, bewegelijke bacteriën kan isoleeren, spreekt van zelf. Voor ronde en elliptische cellen is ze echter niet bruikbaar; deze glijden van de punt af.

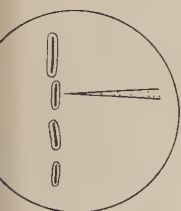
D. *Grootere microorganismen.*

Als ze te groot zijn voor de oogvormige naald no. 1, worden de microorganismen geïsoleerd met oog no. 2, waarvan het lumen 40—50 μ bedraagt. Men gebruikt dit dus voor groote schimmelsporen en kleinere protozoën, maar ook voor cellen, die wel in het kleine oog passen, maar door aanraking van den glasdraad beschadigd zouden kunnen worden, of er aan zouden vastkleven, b.v. amoeben, erythrocyten, enz. In hoofdzaak gaat het isoleeren zooals dit onder B is beschreven. Bij groote cellen, afkomstig uit een door bacteriën verontreinigd medium, moet men er op rekenen, dat er uitwendig vastzittende bacteriën kunnen meegaan. Men voert daarom de geïsoleerde cel eerst door spoeldruppels en controleert tenslotte altijd met sterke vergrooting vóór men met de puntnaald de cel in den cultuurdruuppel brengt.

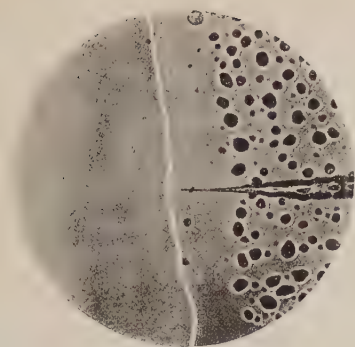
Op sommige cellen zitten de bacteriën zoo vast, dat het eenvoudige afspoelen niet voldoende is. Wanneer de wand het verdraagt (b.v. bij schimmelsporen) kan men deze steriliseeren door een kort bad in zwavelzuur. Het glaasje wordt aldus ingericht (vgl. Fig. 12): 1 is de materiaaldruppel, 2 de spoeldruppel, 3 een kleine druppel geconc. zwavelzuur, 4 gesteriliseerd Na_2CO_3 1 %, 5—9 cultuurdruppels. De sporen worden uit 1 gehaald, in 2 gescheiden van los meegenomen cellen, korten tijd in de kleine zwavelzuurdruppel gebracht en daarna in 4 afgezet. Uit 4 komen de sporen in een der druppels 5—9.

Een eigenaardig geval vormen de snelzwemmende infusoriën. Wij zullen dit daarom in het kort beschrijven (zie ook pag. 267).

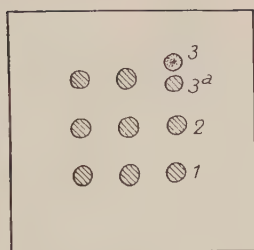
Stel, dat wij in hooi-extract een onzuivere cultuur van allerlei infusoriën hebben gekregen. Wanneer wij daarvan een druppel op het dekglas afzetten, zien we dezen wemelen van bacteriën. 't Is onmogelijk daaruit een infusorium te isoleeren zonder dat de bacteriën bij massa's meegaan en, wanneer ze wat slijmerig zijn, zich ook aan het oog vasthechten. Wij doen daarom het volgende: vlak onder den materiaaldruppel 3 (Fig. 32) en verder op de gewone plaatsen, wordt het glaasje bezet met steriel hooi-extract. De punt van entnaald e, of het draadje van naald f (pag. 223) wordt voorzichtig tusschen 3 en 3a gehouden, zoodat die, zonder algeheele vermenging, met elkaar contact krijgen. (Fig. 33.) Daarna wordt, nadat links het groote isoleeroog is aangebracht, het dekglas op de isoleerkamer gelegd. Men ziet dan dat verscheidene infusoriën zijn overgezwommen in het heldere gedeelte 3a, waaruit ze nu gemakkelijk, nagenoeg zonder bacteriën kunnen worden geïsoleerd en wel op 2 manieren. Men kan het oog in den druppel dicht bij den rand steken en wachten tot een infusorium tusschen het oog en den rand komt doorzwemmen, om het dan uit den druppel te trekken. Men kan ook het oog op een willekeurige plaats in den druppel steken, tegen het dekglas brengen, wachten tot een infusorium er onder doorzwemt, om het dan door een plotselinge, benedenwaarts gerichte beweging op te scheppen. Voor deze beweging vat men F (Fig. 4) tusschen vinger en duim, zoodat men L plotseling omhoog kan drukken. Verschuift men nu met de rechterhand de isoleerkamer en laat men F zakken, dan wordt de geïsoleerde cel weer tegen het glas afgezet. Veronderstel, dat men dit niet wil doen, dat men dus het oog wil fixeeren op eenigen afstand



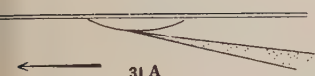
29



30



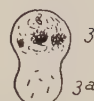
32



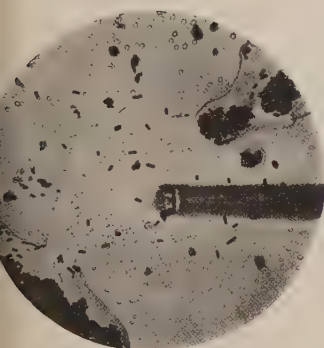
31 A



31 B



33



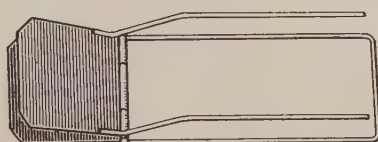
35 A



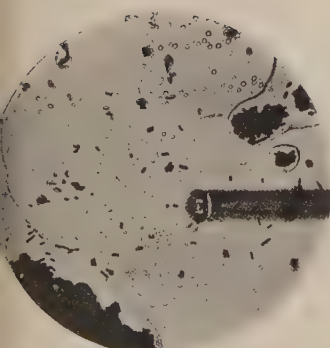
34 A



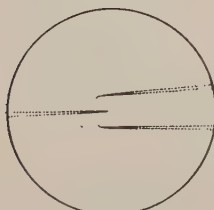
34 B



36



35 B



37

Pl. 6 (Fig. 29—37).

van het dekglas, dan houdt men met wijsvinger en duim F op de juiste hoogte en draait men met de 3e vinger het rondsel C naar boven, totdat de as van F door de as van C wordt geraakt, waarna men F kan loslaten.

Groote infusoriën, b.v. *Paramecium*, isoleert men met het groote isoleeroog no. 3. Het opscheppen moet hier intusschen op een andere wijze gebeuren. Het groote oog brengt n.l. zulk een krachtige vloeistofverplaatsing teweeg, dat het infusorium bij de benedenwaartsche beweging wordt weggestooten. Men plaatst het oog dus, zooals in Fig. 34a is aangegeven, wacht tot een infusorium zich links er van bevindt en drijft het dan een eind verder in de richting van de pijl naar links. (Fig. 34b.) Wanneer men het oog dan plotseling naar beneden beweegt, kan het infusorium niet zijdelings worden weggestooten en is het gevangen.

E. *Zeër kleine celfragmenten (granula, etc.).*

Hoewel men met het fijne isoleeroog zeer kleine druppels kan afzetten, zoodat men met zekerheid kan constateeren, dat er niet meer dan één korreltje in voorkomt, heeft deze wijze van isoleeren in dit geval toch een bezwaar. Kleine korreltjes worden somtijds door het glas van het isoleeroog aangetrokken en laten zich dan niet gemakkelijk meer afzetten. Een goede methode is de volgende:

Onder de op het dekglas gebrachte druppels is er één van bouillon-gelatine, die met een gelijke hoeveelheid water verdund is. Links plaatst men puntnaald no. 8, rechts het groote oog no. 3. Het materiaal wordt over het dekglas uitgestreken, zooals dit is aangegeven onder C. Men duwt de puntnaald in den rand van den gelatinedruppel en beweegt die dan naar omlaag. Dan zal er een bolletje op de punt blijven zitten. Men brengt dit bolletje tegen den korrel aan, dien men wil isoleeren. Deze blijft er aan vastkleven en kan nu, als het alleen maar om de verdere ontwikkeling te doen is, terstond in den cultuurdruuppel worden afgezet; wanneer deze vloeibaar is, door afspoelen, wanneer hij vast is, door afstrijken, zooals onder C is aangegeven. Wil men echter de wijze van ontwikkeling, het ontkiemen, ook controleeren, dan moet de korrel aan den rand van den cultuurdruuppel worden afgezet. Nu komen in een agarhoudenden druppel allicht andere vaste deeltjes voor; en in gelatine kan het contrast wel

eens zeer gering zijn. Daardoor zou men moeite hebben om de plaats terug te vinden. Men zorgt dus altijd wat dood materiaal van *Penicillium*- of *Aspergillus*sporen in voorraad te hebben en zet daarvan bij het inrichten van het dekglasje iets af naast den gelatinedruppel. Dan kan men de plaats van het korreltje kenmerken door er een spore recht tegenover te zetten. Soms is het voldoende wanneer men met de naald dicht bij het korreltje in den rand van den druppel krast.

Men kan op deze wijze ook wel organismen isoleeren, die onder B en C zijn behandeld, b.v. bacteriën, voor zoover ze niet al te zeer aan het glas kleven.

F. *Slijmig materiaal.*

Bij dit materiaal is het van belang de cellen eerst zooveel mogelijk los van elkaar te maken. Men houdt daartoe de cultuurbuis, waarin het zich bevindt, schuin en zet in het bovenste gedeelte een grooten druppel phys.NaCl-oplossing af, waarin men wat materiaal brengt. Daarin wordt met het entoog geklopt en daaruit wordt dan de materiaaldruppel voor het dekglas genomen. Allicht vindt men daarin losse cellen, die zich met het isoleeroog no. 1 of — als ze sterk gekapseld zijn — met no. 2 laten isoleeren. Toch ondervindt men hier wel eens de moeilijkheid, dat het oog bezet raakt met slijm en de bacteriën zich er niet uit laten verwijderen. In dat geval probeert men, althans wanneer men met langwerpige cellen te doen heeft, liever methode C.

Een eigenaardig geval trof ik bij de dextraanbacteriën. Deze leenden zich niet voor een der methoden B-E, maar moesten met de grove punt — beter nog met de oefennaald — overgesleept worden. (Zie pag. 253.)

G. *Het overbrengen van dekglas in cultuurbuis.*

Hiervoor wordt altijd de prepareerkamer gebruikt. Wij onderscheiden hierbij de volgende gevallen:

1e. *De cellen worden terstond na isolatie verwijderd van het dekglas.*

Neem, in plaats van gewone cultuurdroppels, dikke gelatine-droppels. Deze krijgt men als men een druppel afzet, wacht tot deze gestold is, dan een tweeden druppel er onder tegen aan zet,

enz. tot 3 of 4 maal toe. Men isoleert de cel volgens een der bovengenoemde methoden en strijkt die bij zwakke vergrooting af langs den onderkant van den gelatinedruppel, zooals dat onder C op pag. 233 is aangegeven. Men legt hierna het glas op de prepareerkamer en schept den druppel op met de schoffelnaald (pag. 223), om ze dan terstond in de cultuurbuis of — bij dierproef — b.v. subcutaan (zie pag. 274) te enten. Omdat de druppel daarbij allicht iets verschoven wordt en men met de achterzijde van het schoffeltje niet de aangrenzende druppel mag raken, worden er op de ruimte, die anders door 6 cultuurdruppels wordt ingenomen, niet meer dan 4 gelegd.

Op deze wijze kunnen geïsoleerde anaëroben terstond in het cultuurbuisje worden overgebracht; evenzoo bacteriën, die zich niet snel ontwikkelen en die men niet zoo lang in den cultuurdruuppel wil laten (b.v. tuberkelbacillen).

Men bedenke, dat dit opscheppen met de schoffelnaald eenige vaardigheid vereischt; men oefene zich dus van te voren! De gelatinedruppel moet in zijn geheel en met onbeschadigden onderkant, worden opgenomen.

2e. *Het transport heeft plaats na verdere ontwikkeling.*

a. Transport van een zeer jong mycelium:

Heeft dit zich ontwikkeld in een gewonen vasten druppel, dan kan het transport met de schoffelnaald vaak niet gebeuren omdat men, wat dikte en plaatsing der druppels betreft, op het gebruik daarvan niet heeft gerekend. Is het ontstaan in een vloeibaren druppel, dan doet men het met de puntige entnaald e of f liever niet, omdat een teer mycelium zoo licht verdroogt aan de lucht; en de fijne oogvormige entnaald d gebruikt men liever niet, omdat het daaruit niet altijd losspoelt. Men gebruikt in dit geval eerst de dubbele isoleerkamer (pag. 219) om het mycelium over te brengen tegen den onderkant van een dikken druppel; daarna wordt deze met de schoffelnaald in het cultuurbuisje gebracht.

b. Overbrengen uit een in een vloeibaren druppel ontstane cultuur:

Dit zal zich voordoen bij de nakomelingschap van een bacterie of een gistcel. Men gebruikt hiervoor de fijne oogvormige entnaald d. Is de cultuurdruuppel klein of, ondiep,

zoodat ze niet het oog van de naald zou vullen, dan vult men het oog eerst met vloeistof.

Een bijzonder geval doet zich voor bij infusoriën. Deze zijn dikwijls zeer gevoelig voor oligodynamische werkingen die van het platina uitgaan. Heeft een geïsoleerd infusorium zich niet verder dan tot een 10-tal vermenigvuldigd, dan gaat men als volgt te werk. Een glazen buisje van $\pm \frac{3}{4}$ cm lengte en $\frac{3}{4}$ mm inwendige diam., waarvan men er gesteriliseerd in voorraad houdt, wordt vastgekleefd aan een entoog, dat men met bouillon-gelatine heeft gevuld. Hierin zuigt men den cultuurdruppel op, waarna men het in een gewone cultuurbuis losspoelt. Men kan het buisje ook met een gesteriliseerd pincet (zeer bruikbaar is hier een pincet met platina punten) vasthouden. Met dit buisje zuigt men nooit den geheelen druppel op; een deel blijft achter, doorgaans met een deel der cellen.

- c. Overbrengen uit een kolonie, die zich ontwikkeld heeft aan den rand van een gelatine- of agardruppel:
Geschiedt met entnaald d of met puntnaald e.

- d. Transport van een flink ontwikkeld mycelium, dat den druppel ongeveer vult:

Heeft plaats met naald f. Het moet vlug geschieden, daar niet alleen een zeer jong mycelium, maar ook een iets ouder gevaar loopt van uitdrogen aan de lucht. Als men de naald afspoelt in een vloeibaren voedingsbodem, heeft men het voordeel, dat men het mycelium daarin ziet zweven.

Soms zal men bij dit werk behoefte gevoelen aan een loupe. Men kan die plaatsen boven de prepareerkamer; men kan ook gebruik maken van een vergrootingsbril, zooals de microscoopfabrieken die leveren.

Terwijl de isoleertechniek, zooals wij die hierboven voor allerlei microörganismen hebben beschreven, door de ervaring van vele jaren al een vrij hoogen graad van bruikbaarheid heeft bereikt, verkeert de techniek der microöperaties als zoodanig nog in haar beginperiode. Te verwonderen is dit niet. Ze is van jongeren datum en stelt meestal geen geringe eischen aan den onderzoeker.

Men kan hier onderscheiden:

H. *Microöperaties aan losliggende cellen.*

Bacteriën en losse grootere cellen, b.v. infusoriën, hyphen enz., behoeven niet vastgehouden te worden. Men beweegt het mesje eenvoudig naar boven en de cel valt in tweeën. Met een schuine puntnaald werkend kan het gewenscht zijn tevens een geringe heen-en-weergaande beweging (door drukken tegen de micrometerschroef) te maken.

Hierbij dient het volgende opgemerkt te worden:

Om bacteriën te snijden, trekt men volgens de methode, voorgesteld in Fig. 28, strepen van het materiaal op het dekglas. De meeste bacteriën zullen ook in de richting van de streep komen te liggen. Legt men dus het glaasje, na het 90° gedraaid te hebben, op de isoleerkamer, dan zal de scherpe kant van het mes loodrecht op de lengterichting der bacteriën staan en bij opwaartsche beweging snijden. (Fig. 35a en b.) ¹⁾ Wil men met de punt snijden, dan draait men het dekglasje niet 90° om.

Men brengt op het glaasje verder één kleinen, vloeibaren druppel. Want liggen de cellen droog, dan worden ze bij het snijden beschadigd. Een smal vloeistofzompje om de cel is dus noodig. Bij te veel waterdamp vormt zich echter om de cellen een hoeveelheid vloeistof, die het snijden minder gemakkelijk maakt, doordat de vloeistof langs het mes trekt en een of beide celhelften meeneemt. Een en ander is goed te regelen door de mica-bruggen, daar waar zij buiten de isoleerkamer uitsteken, iets naar buiten te schuiven; door de openingen, die hierdoor ontstaan, kan het teveel aan waterdamp ontwijken. Dit middel kan men steeds toepassen, als er te veel waterdamp is; het werkt langzaam en nauwkeuriger dan het opbeuren van het dekglas. Men drukt met het mesje vooral niet sterker dan juist noodig is om de cel te halveeren, daar door te sterken druk de fijne scherpe kant beschadigd kan worden (glas tegen glas!). Bij het snijden van langere hyphen hindert een iets breedere vloeistofzoom niet, daar hier geen gevaar bestaat voor het wegspoelen. Bij het maken van reïnculturen van fungi imperfecti vindt dit toepassing. Men snijdt een flink stuk van een

¹⁾ In dit preparaat waren de bacteriën niet in strepen getrokken; de witte lijn in het mesje (oud model!) geeft den scherpen kant aan.

hyphe af en brengt dat met de rechts in den micromanipulator staande puntnaald over in den cultuurdruuppel; is de draad wat groot, dan wordt ze eerst eenige malen met de puntnaald opgevouwen. Ronde cellen, b.v. van gist, zijn met het mesje niet te snijden, daar ze tusschen den scherpen kant en het dekglas wegschuiven; het beste gaat dit nog met een korte, scherpe punt.

Aan het mesje kunnen celfragmenten blijven vastkleven. Bij een puntnaald is dit niet zoo; deze blijft zuiver, en men ziet volkomen duidelijk wat men er mee doet.

De scherpe kant van het mes (zoowel van het glazen als van het stalen mes) ziet men het best bij wijdgeopende iris. Het breedere deel van de naald, dat zich juist onder den scherpen kant bevindt, kan schaduwen werpen; door verplaatsing van den spiegel worden deze weggewerkt. Ook bij het gebruik van de loodrechte punt zorgde men voor een goeden stand van den spiegel. (Zie onder J.)

J. *Microöperaties aan weefsels.*

Hiervoor is noodig een apparaat om het object vast te houden en een apparaat om het te snijden; om dus, in 't algemeen, verwondingen aan te brengen.

Voor het eerste dient het micropincet; voor het tweede gebruikt men het stalen mesje voor grof werk, een scherpe punt of het glazen mesje voor fijn werk, de loodrechte punt om cellen uit elkaar te trekken of kleine onderdeelen er uit te verwijderen, dikkere naalden met een korte, zeer scherpe punt voor kleine verwondingen en het stootsgewijze doorboren van taaie celwanden; de micropipet voor het injiceeren van vloeistoffen.

Bij deze werkzaamheden zou het object, als het niet werd vastgehouden, verschoven worden; het doorboren van de taaie plantaardige celwand zou onmogelijk zijn als er geen tegendruk werd uitgeoefend.

Door den opwaartschen druk die, zoowel door de pincetpunten als door het mes, op het weefsel wordt uitgeoefend, kan het dekglasje worden opgebeurd. Bij microöperaties wordt daarom de vaseline van de zijanten van de isoleerkamer en van de micabruggen weggenomen en vervangen door de taaiere verdikte vaseline (pag. 221). Bij sterker druk kan men het glasje nog extra vastleggen door twee klontjes zachte paraffine, die

men met een warme naald doet smelten. Men kan ook gemakkelijk een zwak veerend klemmetje construeeren, waartusschen de geheele isoleerkamer met het dekglas wordt geklemd en dat aan weerszijden, ter plaatse van de micabruggen, drukt. (Fig. 36.) De instelling van pincet en snijnaald moet zorgvuldig geschieden bij zwakke vergrooting. Teneinde voor de moeilijker bewegingen van het snijden de linkerhand ter beschikking te hebben, plaatst men het pincet rechts en de naald, waarmede geöpereerd wordt, links. Voorts zorgt men er voor, dat de laatste het object raakt dicht bij de vastliggende naald G van het pincet; ze behoeft dan, wanneer men naald H beweegt, niet verplaatst te worden. (Fig. 102.) Hoe dichter de pincetpunten bij elkaar staan, hoe beter het object wordt vastgehouden. Soms is het niet onvoordeelig om eenige spanning in het weefsel aan te brengen door de punten eerst dicht bij elkaar te zetten en daarna iets uit elkaar te schuiven.

Het pincet, de loodrechte snijnaald, de mesjes en de andere naalden, die men tegelijk met het pincet wil gebruiken, worden zoo gesteld, dat ze, wanneer de schroeven A 6 mm zijn uitgeschroefd, iets voorbij het midden reiken. (Fig. 37.) De bedoeling hiervan is deze: door indraaien van de linker en rechter schroef A kan men snijnaald en pincet dan over den grootsten afstand van elkaar verwijderen zonder opnieuw het pincet te stellen. Vooral bij elastisch weefsel is dit van groot belang.

Men houde het tot een gewoonte om terstond na afloop van isolatie of microöperatie de naalden, enz. te reinigen in petroleum-aether, desverkiezend (na het werken met pathogene organismen altijd!) ook in zwavelzuur en ammonia. Daardoor voorkomt men het vastdrogen van vreemde deeltjes op de naald.

K. *Wenken bij het gebruik van den micromanipulator.*

Na den lezer voldoende te hebben ingelicht over den normalen gang van het werk, moet ik hier nog enkele wenken geven, o.a. in verband met voorkomende moeilijkheden.

1. *Volgorde der oefeningen.*

Aanvangers beginnen, om met de geheele methodiek (ook met het instellen der naalden, enz.) vertrouwd te raken, met de oefennaald. Deze is, als ze breekt, weer gemakkelijk te vervaardigen

(zie pag. 299). Men kan met deze naald, ter oefening, zelfs werk doen van meer beteekenis, n.l. schimmelsporen en gistcellen uit een druppel isoleeren. Daartoe zet men het bolletje, dat zich aan het eind bevindt, achter de cel of, nog beter, naast de cel en beweegt het dan in de richting van den cultuurdruuppel. Zoo kan men er de cel mede overslepen naar een cultuurdruuppel en een reincultuur maken. Met gistcellen en schimmelsporen levert dit, al is de methode vrij omslachtig, geen bezwaar, daar het bij zwakke vergrooting kan geschieden. Een bacterie met de sterkste vergrooting in het druppeltje te blijven volgen, terwijl deze wordt gesleept, is echter zeer vermoeiend en met kleine bacteriën nauwelijks te doen. Heeft men te maken met groote, klevende cellen, b.v. van *Oidium albicans*, dan kan men probeeren de knop van de naald in den materiaaldruuppel te steken en, als er één cel aan blijft kleven, die zonder slepen overbrengen. Misschien wil dit af en toe gelukken.

Eerst na voldoende ervaring met deze oefennaald gaat men over tot het werken met een der andere. Men begint met gemakkelijk materiaal, dat met middelmatige vergrooting en het groote isoleeroog no. 2 kan bewerkt worden, b.v. schimmelsporen (*Asp. niger*, *Penicillium*) of gistcellen (bakkersgist); daarna hetzelfde materiaal met het kleine oog no. 1. Eerst daarna komt het moeilijker materiaal in behandeling: granula volgens de kleefmethode (korte punt en gelatine), infusoriën met het groote oog, bacteriën met het fijne isoleeroog of met de slappe punt. Van bacteriën kiest men altijd eerst de groote (*B. subtilis*, anthrax), later kleine (*B. coli*, tuberculosis). Tot de lastiger opgaven behoort ook het isoleeren van bacteriën uit slijmig materiaal.

2. *Gevaren voor de naalden.*

Dat de micromanipulator niet het meest aangewezen instrument is voor onhandige en slordige werkers, is wel duidelijk en heb ik tot mijn teleurstelling ook moeten ervaren. Meer dan eens werden naalden reeds bij de eerste oefeningen stuk gestooten, de oorzaak van de ramp gezocht in de methode en in het toestel, waarna dit dan een plaats kreeg bij de ongebruikte, misschien wel „onbruikbare” apparaten.

Een lastige omstandigheid is tot hiertoe zeker geweest de moeilijkheid van het vervaardigen der naalden. Was een naald

of een micromesje gebroken, dan beteekende dit stilstand in het werk. Want al had ik reeds in 1907 mijn microcauter beschreven, voor anderen bleek de praktijk veel moeilijker dan de theorie. Veel propaganda maken voor deze techniek durfde ik eigenlijk niet, omdat ik het vervaardigen — vooral van de fijne isoleeroogen — zelf ook niet zoo gemakkelijk vond. Tenslotte heb ik intusschen de methode zoo kunnen vereenvoudigen en stabiliseeren (zie Hoofdstuk IV), dat er voortaan in ieder wetenschappelijk centrum wel iemand kan zijn — een handige amanuensis of, als hij er lust in heeft, de onderzoeker zelf — die de verschillende naalden, ook zelf gekozen modellen, op vlotte wijze vervaardigt. Gemakkelijk is het zeker, dat voor die vervaardiging de naaldhouders van den micromanipulator kunnen gebruikt worden, aangevuld met enkele eenvoudige bijapparaten. Toch vrees ik, dat, nu het werken met den microcauter onder ieders bereik is gebracht, in de toekomst menig onderzoeker zich tevreden zal stellen met minderwaardig materiaal, wat een zeer nadeeligen invloed zal hebben op de wetenschappelijke resultaten. Men zoek dan echter nooit de schuld bij de micromanipulator-techniek als zoodanig!

Wat het gebruik betreft, moge ik hier nog op enkele punten, ook op gevaarlijke momenten, wijzen.

Kies voor het werk een rustige omgeving, liefst een afzonderlijke kamer.

Draai bij het plaatsen in en verwijderen uit het apparaat, de tubus van het microscoop zoo hoog mogelijk en zet daarbij de revolver als het kan zoo, dat de naald niet tegen een objectief kan stooten.

Blijkt het bij zwakke vergrooting, dat de naald niet meer in het gezichtsveld is, controleer dan vóór men het microscoop verschuift den stand van de naald met het bloote oog en blijf dat doen onder het verschuiven.

Als bij sterkere vergrooting de naald zich niet meer in het gezichtsveld bevindt en er ook door een opwaartsche beweging niet in is te krijgen, is het niet raadzaam lang achtereen aan de schroeven A en B te draaien. Daardoor kan men licht de punt tegen de wanden van de isoleerkamer stuk stooten of, als men met 2 naalden werkt, breken tegen de andere naald. Neem dan eerst de zwakke vergrooting en zorg, dat de punt op de goede plaats komt.

3. *Wenken in verband met de druppels op het isoleerdekglaasje.* (Zie ook pag. 216.)

De materiaal- en de cultuurdruppels moeten scherp begrensd, de rand dus goed zichtbaar zijn. 't Is duidelijk, dat men dit krijgt bij een bollen en niet bij een vlakken, uitvloeienden vorm. Soms ziet men de druppels reeds bij het afzetten tegen het dekglas op ongewone wijze uitvloeien; de oorzaak kan dan liggen in onvoldoende afkoeling van het dekglas. Maar 't is ook niet gewenscht dat later, in de broedstoof, de druppels zich uitbreiden. En nu komt dit toch wel voor en de eene vloeistof vertoont dit in sterker mate dan de andere. Zeer goed bruikbaar is physiol. NaCl. Deze vloeistof geeft scherp begrensde, niet uitvloeiende druppels, terwijl de kleine druppel, die men met de geïsoleerde bacterie uit den grooten trekt, zich gemakkelijk van dezen losmaakt. Andere vloeistoffen, zooals bouillon, serum, hooi-extract, enz., vertoonen, hetzij terstond, hetzij later, min of meer neiging tot uitvloeien en vormen niet altijd een duidelijken rand. Beide gebreken kunnen worden weggenomen door toevoeging van 3% gelatine (bij bouillon kan men b.v. nemen 1 deel bouillon-gelatine op 3 deelen bouillon). Het uitvloeien kan ook voorkomen worden door een vast lichaam in den druppel te brengen, b.v. een stukje van een vasten voedingsbodem, een steriel glaskorreltje. 't Is raadzaam, als men later uitvloeien verwacht, de druppels niet te groot te nemen. (Zie ook pag. 222 4a.) Soms is NaCl verboden, b.v. voor infusoriën, die zich hebben ontwikkeld in hooi-extract. Onder deze zijn er die snel in physiol. NaCl te gronde gaan.

Het uitvloeien der druppels is ook de reden waarom men nooit in de onmiddellijke omgeving van een cultuurdruuppel een cel mag laten liggen. Ze 'zou in den druppel kunnen geraken, of bij het later overenten van dekglasaasje in cultuurbuis kunnen worden meegenomen.

Heeft de cultuurdruuppel een onduidelijken, vlak uitloopenden rand, dan krijgt men het nadeel, dat men niet goed kan zien, of men de bacterie in den druppel heeft afgezet, dan 'wel daarbuiten. Als men stollend materiaal, b.v. bouillon-agar, te heet afzet, is zulk een rand bovendien spoedig uitgedroogd tot een dun vliesje, waarin de geïsoleerde cel zich niet kan ontwikkelen. Hoe in een goed preparaat de bacterie juist aan den rand van den druppel komt te liggen, toont ons Fig. 26. Daar neergelegd,

kan de ontwikkeling met de sterkste vergrooing worden gevolgd.

De ervaring heeft mij in dezen, wat bouillon betreft (met andere media zal het ook wel ongeveer zoo zijn) het volgende geleerd:

Bouillon-gelatine geeft bolle druppels met een goed zichtbaren rand, mits ze niet te warm worden afgezet. Men neemt daarom een buisje, waarin de gelatine recht gestold is, verwarmt boven de spaarvlam van een Bunsen-brander een plekje aan de oppervlakte en draait daarna buiten de vlam het buisje 180° om de lengte-as, zoodat de kleine hoeveelheid vloeibaar geworden bouillon-gelatine tegen het koude glas komt. Daaruit worden, met afgekoeld entoog, de druppels afgezet. Een voordeel van bouillon-gelatine is de helderheid. Een bezwaar is, dat het contrast met de zich er in bevindende bacteriën niet altijd duidelijk is. Een ander bezwaar is nog, dat bij hogere broedstooftemperaturen het aan den rand afgezette organisme naar het midden zakt en zich daar ontwikkelt; men kan dit echter voorkomen, door de vochtige kamer niet horizontaal, maar onder een hoek van 45° te plaatsen, zoo dat de geïsoleerde cellen zich aan de laagst-gelegen rand bevinden. Immersie-olie wordt daarbij van het glaasje verwijderd.

Bouillon-agar geeft troebele druppels. Op pag. 222 wezen wij er reeds op, dat de rand, ook al gebruikt men de entnaalden b of c, altijd onduidelijker is dan die van gelatinedruppels en min of meer droog. In 't algemeen kan ik ze daarom niet sterk aanbevelen.

Bouillon-gelatine + bouillon-agar ¹⁾, in gelijke hoeveelheden gemengd, heeft een stollingspunt van $32-33^\circ$ en behoeft dus niet zoo heet te worden afgezet. De rand is beter dan van bouillon-agar. Men kan ook nemen bouillon-gelatine + bouillon-agar in de verhouding 2 : 1.

Wat helderheid betreft, lette men altijd op stofdeeltjes, die op de lenzen van het microscoop, vooral van het oculair, voorkomen en die aanleiding kunnen geven tot vergissingen.

Bij sommige proeven heeft men op één glaasje veel druppels nodig. Men kan er uit een gewonen druppel 100—150 afzetten in regelmatige rijen met behulp van het groote isoleeroog no. 3.

¹⁾ Prall, Beitrag zur Kenntnis der Nährböden u.s.w Arb. a. d. Kais. Gesundh. 1902, p. 436.

('t Is niet ongewenscht dit oog, omdat het zoo groot is, na de zwavelzuur-ammonia-behandeling eerst in een buisje met steriel water na te spoelen.) 't Gemakkelijkst gaat dit bij zeer zwakke vergrooting, b.v. met obj. 3 Leitz, waarvan men de frontlens heeft afgeschroefd. Met giscellen werkend (pag. 271) bleken deze druppeltjes groot genoeg om een flinke ontwikkeling toe te laten, b.v. van 300 cellen, zonder dat iets bemerkt werd van schadelijke stofwisselingsproducten. Bij sommige bacteriën kon ik echter een verschil zien met gewone cultuurdruppels, waarin de vermenigvuldiging wel langer doorging. In hoeverre hier voedselgebrek dan wel stofwisselingsproducten in het spel zijn, blijft altijd een lastige vraag.

Het afzetten van deze kleine druppels kan ook in andere gevallen van nut zijn. Ik noem een enkel voorbeeld. Wanneer men cellen moet isoleeren, waarvan er maar weinige in het materiaal voorkomen, is het soms moeilijk ze in de massa van den gewonen materiaaldruppel te ontdekken. In zulk een geval verdeelt men het materiaal; men neemt met het groote isoleeroog ± 12 kleine druppels uit den materiaaldruppel en zet die in een paar rijen af.

De aanwezigheid van den materiaaldruppel op hetzelfde glaasje als de zich ontwikkelende reïncultuur, levert geen bezwaar. Over 't algemeen blijft het ruwe materiaal in dien druppel opgesloten. Zelfs kan het controleeren van den materiaaldruppel zijn nut hebben, als het ons b.v. leert hoe bepaalde organismen zich in mengcultuur (de natuurlijke toestand!) gedragen. Anders wordt het echter, als in dien druppel schimmels ontkiemen; dan treden de hyphen er buiten en zouden zij in de cultuurdruppels kunnen groeien. Men kan dit verhinderen door tijdig het preparaat op de prepareerkamer te leggen en een spoortje van een sublimaatoplossing of een kristalletje boorzuur in den druppel te brengen.

Wil men een druppel van het isoleerglaasje verwijderen, dan geschiedt dit met een strookje filtreerpapier van 7×3 mm; men bewaart deze gesteriliseerd in een buisje. Een entoogje wordt gedoopt in bouillon-gelatine en daaraan het papiertje vastgekleefd.

4. *Werken met één naald in het apparaat.*

Aanvangers zien er — en terecht! — tegen op om met twee

naalden tegelijk te werken. Daarom zij er op gewezen, dat men in veel gevallen ook kan werken als men de benodigde naalden na elkaar gebruikt. Zelfs heb ik ongeveer 25 jaar geleden ¹⁾ mij laten verleiden enkele toestellen te vervaardigen met één links staande naald. In principe acht ik het echter verkeerd de mogelijkheid om met 2 naalden te werken af te snijden, zoodat ik op dien weg niet ben voortgegaan.

Wil men met één naald in het apparaat b.v. bacteriën isoleeren, dan begint men met de oogvormige no. 1 links te plaatsen en daarmee de bacteriën af te zetten in kleine druppels naast de cultuurdruppels. Daarna wordt het glaasje opgenomen en snel gelegd op de prepareerkamer, die men vlak naast het microscop heeft gezet. Men vervangt nu de oogvormige naald door de puntige en legt het glaasje weer snel op de isoleerkamer. Men zal zien, dat de druppeltjes met de bacteriën, tenzij men ze al te klein heeft genomen, niet verdampt zijn, zoodat de bacteriën in de cultuurdruppels kunnen worden geschoven. 't Is intusschen denkbaar, dat bacteriën, die zeer gevoelig zijn, zelfs voor een kort durende concentratie-verhooging van het medium, bij het transport door de lucht eenig nadeel kunnen ondervinden. Dan neme men dus 2 naalden tegelijk.

5. *Het reinigen der naalden.*

Ik stel voorop, dat voor goed werk de naalden schoon, d.w.z. hun oppervlakte glad moet zijn. Anders toch blijven kleine deeltjes er aan vastkleven. Met oude naalden, die verweerd zijn, gebeurt dit gemakkelijker dan met nieuwe. Ouderdom — ik wees er reeds op — kan dus een reden zijn om een naald te verwijderen. Het herhaaldelijk steriliseeren vóór het gebruik en reinigen na het gebruik kan voldoende zijn om de naald schoon te houden. Toch gebeurt het meermalen, vooral als men met slijmig materiaal werkt, dat zich een laag op oog of punt afzet, die niet door het gewone steriliseeren wordt weggenomen. Tusschen de fijne vuildeeltjes kunnen bacteriën zich verstoppen, om later op een ongewenscht moment weer los te laten. Vóór het reinigen wordt de naald eerst in petroleum-aether gedompeld. Men kan dan verder de volgende methoden volgen:

¹⁾ Verslag Kon. Akad. van Wetensch. Vergadering van 24 Dec. 1910.

1. in sterk zwavelzuur gedurende langeren tijd. Men zet de naaldhouder met naald omgekeerd in een statief, de punt van de naald in een beerglassasje met wat sterk zwavelzuur en laat die zoo eenige uren staan.
2. in sterk zwavelzuur, verhit op 100° . Opstelling als boven. De temperatuur wordt niet te snel tot $\pm 100^{\circ}$ opgevoerd en daarop eenige minuten gehouden. Daarna afkoelen, afspoelen in water en tenslotte in ammonia.
3. in KOH-oplossing. In sommige gevallen, o.a. als er plasmaresten op het glas kleven, helpt zwavelzuur niet. Dan houdt men de naald, op dezelfde wijze in een statief bevestigd, met de punt in een 3%-oplossing van KOH in alcohol van 96%. Daar ze hierin eenige uren moet verblijven, gebruikt men, om verdamping te voorkomen, een afsluiting met b.v. 2 aansluitende glasplaatjes, die zoo zijn ingevuld, dat de naald er juist door heen gaat.
4. mechanische reiniging. Het kan voorkomen, dat een groote cel, b.v. een schimmelspore, in het oog geklemd blijft. Dan helpen bovengenoemde methoden soms niet, maar moet het vreemde voorwerp langs mechanischen weg verwijderd worden. Hiertoe houdt men in kultuur een schimmel met ronde, niet al te groote sporen, b.v. *Aspergillus niger*. Van een kleine hoeveelheid sporen maakt men een papje en zet daarvan iets af op een dekglasje. Met het oog wordt nu, door snelle bewegingen van staaf F (Fig. 4) door de sporenmassa heen, tegen het dekglas geklopt. In een naast-bijzijnden druppel, dien men eveneens op het dekglas heeft afgezet, kan men controleeren of de cel is verwijderd.

Dikwijls wil echter een taaie, kleverige massa op de naald voor de ronde schimmelsporen niet wijken. Dan neemt men scherpe deeltjes, b.v. *Ferrum reductum*, in een hangenden druppel en haalt het oog, bij zwakke vergrooting, er niet te snel door heen. De ijzerdeeltjes schuren de korst er af, soms in zijn geheel. Wat er misschien nog mocht achterblijven, kan dan met zwavelzuur verwijderd worden.

Wanneer de vloeistof zich in het oog plotseling terugtrekt, kan dit een aanwijzing zijn om de naald nog eens te ontvetten, te steriliseeren of extra te reinigen. Vóór alles ga

men in dit geval echter na of de zijspleten van de isoleerkamer wel voldoende met olie zijn afgesloten!

6. *Oorzaken van mislukking der eencel-cultuur.*

Wie met den micromanipulator werkt, ondervindt het meermalen, dat geïsoleerde cellen zich niet ontwikkelen. De oorzaak zou kunnen liggen in het sterke licht, dat bij het microscopisch onderzoek nu eenmaal noodig is, zelfs al zijn de schadelijke stralen er uit weggenomen. Bepaalde bewijzen voor die onderstelling heb ik niet gevonden. Toch verdient het aanbeveling, wanneer men een buitengewone gevoeligheid voor licht vermoedt, niet te lang met hetzelfde preparaat te werken. Op één dekglasje isoleert men dan niet meer dan 1 of 2 bacteriën.

Een andere oorzaak van mislukking — een kwestie, die wacht op nader onderzoek — kan zijn de verandering van de P_H , waaraan druppels (groot oppervlak, klein volumen!) eerder bloot staan dan de voedingsbodems in buisjes of kolven. Druppels van allerlei cultuurmedia (bouillon, bouillon-gelatine, enz.) hebben neiging tot zuur worden. Een stukje filtreerpapier van 3×7 mm, gedrenkt in 2% KOH-oplossing, op den bodem (niet in het midden) van de vochtige kamer geplaatst, kan dit voorkomen, in zooverre het CO_2 van de lucht er door wordt geabsorbeerd. Men kan deze fout ook wegnemen door het gebruik van buffers. Ook kan men, terstond na de isolatie, den druppel in de cultuurbuis brengen. Als wij dit laatste doen, vervalt echter een van de voordeelen van den micromanipulator: de contrôle van het ontstaan der kolonie.

Als andere mogelijke factoren wil ik alleen nog noemen — nader onderzoek moet ook hier volgen — het ontbreken van vitaminen of van bios in den voedingsbodem. Tasten wij bij 't bovengenoemde grootendeels in 't duister, soms is de oorzaak van mislukking duidelijker. Dit geldt allereerst de ouderdom van de cultuur. Wanneer men uit een bacteriën-cultuur wil isoleeren, neme men deze zoo jong mogelijk. 't Is bekend, dat de vermenigvuldiging zeer snel, soms al na weinige uren, minder wordt, om plaats te maken voor een sterker afsterven. Wij moeten niet isoleeren van een cultuur, waarvan de meeste cellen dood zijn, of bijna dood, althans niet meer in staat zich te deelen. Merkwaardig is het intusschen, dat niet alle bacteriën op dat punt

even gevoelig zijn. Zoo ontwikkelen zich b.v. ook uit iets oudere culturen van coli haast alle geïsoleerde cellen. Bij gistcellen is de verhouding over 't algemeen ook zeer gunstig.

Men houde ook rekening met de mogelijkheid, dat er tijdens de ontwikkeling van een cultuur perioden kunnen zijn van groote gevoeligheid, afwisselend met perioden van ongevoeligheid. Onderzoekingen van den laatsten tijd, die zeer zeker moeten worden voortgezet, wijzen hierop.

Ten slotte kan een negatief resultaat samenhangen met algeheele onbekendheid van den geschikten voedingsbodem. Moet men dus uit ruw materiaal organismen van onbekend gedrag isoleeren, dan verdient het aanbeveling om, bij wijze van voorloopige proef, op het dekglasje een materiaaldruppel en cultuurdruppels van verschillende voedingsbodems aan te brengen en in elk daarvan een of meerdere cellen, desnoods in gezelschap van cellen van andere soort, af te zetten. Dit werk is gemakkelijker en gaat sneller dan het telkens isoleeren van één cel; het geeft dikwijls aanwijzing met betrekking tot den te gebruiken voedingsbodem en men kan er dus veel vergeefschen arbeid door uitsparen.

HOOFDSTUK III.

Eenige toepassingen.

De bedoeling van deze verhandeling is een zeer persoonlijke: ik heb een beschrijving willen geven van den micromanipulator, zooals ik die heb geconstrueerd. Om daarbij eenig denkbeeld te geven van de mogelijkheden, die mijn apparaat biedt, voeg ik er aan toe een korte beschrijving van enkele resultaten, die ik er mede bereikte, daarbij telkens verwijzend naar de uitvoeriger verhandelingen, voor zoover deze reeds zijn verschenen. Want sommige mededeelingen zijn voorloopig en zullen later, naar ik hoop, gevolgd worden door uitvoeriger publicaties. 't Is dus niet mijn bedoeling een uiteenzetting te geven van deze microtechniek in 't algemeen, hoe verleidelijk het mij ook toeschijnt eigen werk te mogen combineeren met de voortreffelijke resultaten, die andere onderzoekers op dit gebied bereikt hebben en hoe gaarne ik wil toegeven, dat daardoor van het onmetelijke veld, dat met deze techniek kan worden bewerkt, een juister denkbeeld zou worden gevormd. Dat ik zelf de methode betrekkelijk weinig heb toegepast, vindt zijn oorzaak niet in haar tekort aan bruikbaarheid, maar eenvoudig in gebrek aan gelegenheid. Het uitwerken van de methodiek ging met zooveel moeilijkheden gepaard, dat van den beschikbaren tijd niet veel kon overblijven voor wetenschappelijke toepassingen.

In de 36 jaar, waarin ik met den micromanipulator werk, heb ik natuurlijk van zeer veel microörganismen reïnculturen gemaakt, zoowel voor eigen onderzoek als op verzoek van anderen, die met de gebruikelijke methoden (plaatcultuur, verdunning, enz.) niet tot een gewenscht resultaat konden komen. De beschrijving daarvan zou voor de lezers, die kennis hebben ge-

nomen van het voorafgaande, niets nieuws brengen. Ik wil daarom, wat isoleeren betreft, eenige andere toepassingen bespreken en wel allereerst op het gebied van de variabiliteit, waarvan het onderzoek juist door de individueele behandeling der microörganismen mogelijk is geworden. Daarbij heb ik nooit van de plaatcultuur gebruik gemaakt; alle reinkulturen zijn dus ééncelculturen.

A. Variabiliteitsproeven.

Het begrip variabiliteit in de ruimste beteekenis opvattend, kunnen wij 3 categoriën onderscheiden.

I. In de cultuur komen 2 of meer vormen van cellen voor, die voortdurend in elkaar overgaan en die zich dus niet afzonderlijk als zoodanig laten kweken.

Hiervan beschrijf ik 2 gevallen:

1. Overgang van staafjes in vibrionen, en omgekeerd.

Kohlbrugge¹⁾ vond in culturen, aangelegd uit gelatineplaten van faeces-bacteriën, een mengsel van vibrionen en staafjes. Een herhaling van de plaatcultuur, ditmaal op vleesch-agar, gaf enkel staafjes. Wanneer hij daaruit gelatine-culturen aanlegde, gaven deze in den aanvang alleen staafjes, later echter, wanneer ze vervloeid waren, weer staafjes en vibrionen. Op geen manier gelukte het hem de oorzaak van dit verschijnsel te ontdekken en o.a. een reinkultuur van vibrionen te krijgen. Op zijn verzoek isoleerde ik eenige vibrionen; ik legde op den bodem van de vochtige kamer een druppel water. De kolonies ontwikkelden zich zoodoende in het condensatiewater, dat op de druppels vleeschgelatine neersloeg en bestonden, ook als ze eenige dagen oud waren, nog steeds uit sterk bewegelijke vibrionen. Uit die kolonies werd overgeënt op vleeschgelatine, op 10 × verdunde vleeschgelatine en op pepton 1%. Na 2 dagen bestonden de eerste uit evenveel vibrionen als staafjes, de laatste twee bijna alleen uit vibrionen. Ook isoleerde ik vibrionen,

¹⁾ S. L. Schouten. Akad. proefschrift 1901 pag. 107. Reinkulturen uit één onder het microscoop geïsoleerde cel. Dr. J. H. F. Kohlbrugge, Symbiose zweier pleomorpher Faeces-Bakterien. Arch. f. path. Anat. Bd. 163, pag. 365.

maar liet die zich ontwikkelen in vochtige kamers, *zonder* water op den bodem, dus op een droge oppervlakte der cultuurdruppels. In verband daarmee bestonden de kolonies aanvankelijk uit onbewegelijke, dikke vibrionen, terwijl er op den derden dag in de kolonies, naast de vibrionen, reeds staafjes voorkwamen.

Uit deze proeven bleek dus duidelijk, dat een vibrio staafjes kan voortbrengen, terwijl het zeer waarschijnlijk is, dat de physische natuur van den voedingsbodem hierbij een rol speelt en wel in dien zin, dat op een vasten voedingsbodem eerder staafjes, op een vloeibaren eerder vibrionen ontstaan. Werd uit een vibrionenkolonie op agar geënt, dan zag men na 2 dagen daarop niets dan bewegelijke staafjes; werd uit die agar-kultuur weer in bouillon geënt, dan vond men na 2 dagen weer sterk bewegelijke vibrionen. In 4 dagen liep dus de overgang van vibrionencultuur in staafjescultuur en omgekeerd, af.

2. Naakte en gekapselde cellen bij dextraanlactococcen.

Een voorschrift van Beyerinck ¹⁾ volgend, kan men door enting van gistwater + 10% rietsuiker met tuinaarde of rioolwater een krachtige ontwikkeling van dextraanlactococcen krijgen. In den aanvang zijn dit alle coccen, diplo- en streptococcen zonder kapsels. Hierin ziet men na eenigen tijd cellen met zeer dikke kapsels ontstaan. Volgens Beyerinck zijn deze identiek met de bekende *Leuconostoc mesenterioïdes* v. Tiegh, de „Froschlaichpilz” van de suikervabrieken. De vraag bleef intusschen gerechtvaardigd: zijn deze beide vormen (de kapsellooze en de gekapselde) identiek? Gaat dus de eene vorm in de andere over en zoo ja, hoe geschiedt dit? Of zijn het twee afzonderlijke soorten, uit het ruw materiaal van de ophoopingsproef afkomstig?

Jan Smit ²⁾ streek, om deze vraag op te lossen, platen uit; op honderde kolonies van den kapselloozen vorm waren er soms een of twee van den gekapselden, waarin echter microscopisch onderzoek altijd nog enkele ongekapselde bacteriën aantoonde. En hoevele malen het uitstrijken ook her-

¹⁾ Beyerinck, *Folia microbiologica*, I, p. 396.

²⁾ Jan Smit, *Kapselbildung bei Dextranlaktococcen*, *Folia micr.* V. I. (1917).

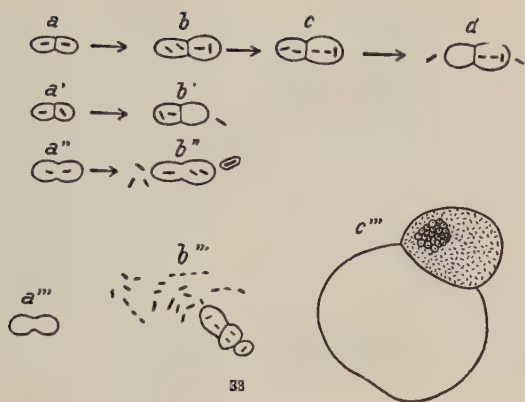
haald werd, een reincultuur van den gekapselden vorm kreeg men niet. Afwasschen in steriele NaCl-oplossing, verandering van temperatuur, van rietsuiker- of gelatine-concentratie, van reactie van den voedingsbodem, van luchttoevoer, kweken in vloeibaren voedingsbodem — 't bleef alles zonder resultaat.

Ik heb toen beide soorten van cellen geïsoleerd. De naakte cellen vermenigvuldigden zich aanvankelijk alleen tot naakte; eerst later ontstonden er gekapselde. Na 48 uur zag ik altijd hetzelfde beeld: naakte cellen in groote overmaat, daartusschen enkele klompjes van gekapselde. Bij de geïsoleerde gekapselde cellen zag ik het merkwaardig verschijnsel, dat de cel in den kapsel zich deelde tot 3 of 4 cellen en dat daarna 1 of 2 cellen uit den kapsel kropen om zich daar buiten te gaan vermenigvuldigen. In Fig. 38 is dit voor 3 gevallen voorgesteld; in d ziet men de twee cellen uit den kapsel gekropen, waarvan een zich al vrij ver heeft verwijderd. Het resultaat was dus, dat men na 48 uur hetzelfde beeld zag als bij de nakomelingschap van den ongekapselden vorm. In Fig. 39 ziet men: a''' een dubbele gekapselde cel (het contrast tusschen de cel en de kapsel is, zooals in dit geval, dikwijls niet te zien); b''' de kolonie na 24 uur; c''' de kolonie na 48 uur, bij zwakke vergrooting, aan den buitenkant van den druppel ontwikkeld en bestaande uit ongekapselde staafjes, waarbinnen een klomp kapselcellen.

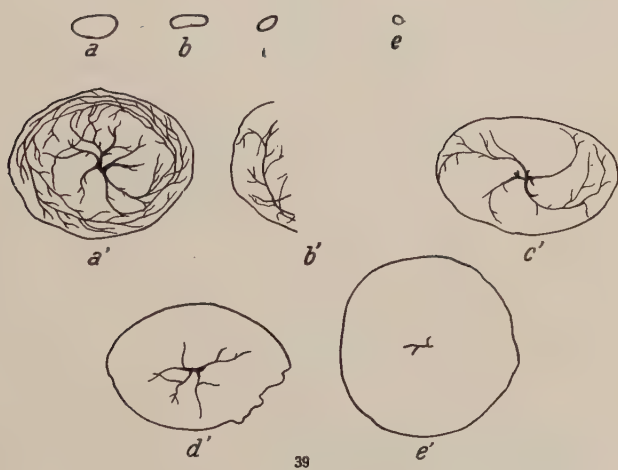
De identiteit van beide vormen was door dit experiment beezen en tevens was het duidelijk geworden, waarom hier de plaatcultuur geen resultaat had kunnen geven.

Nog een opmerking: bijna alle kapselcellen zijn van buiten bezet met ongekapselde staafjes. Deze zitten er zoo vast op, dat ze er zelfs door kloppen met de isoleernaald niet van zijn los te krijgen. Men kon dus alleen zekerheid verkrijgen door een van de weinige kapselcellen te isoleeren, die vrij waren van staafjes en daarbij was het noodig de kapselcel met de isoleernaald om te wentelen, om ze zoo van alle kanten te onderzoeken.

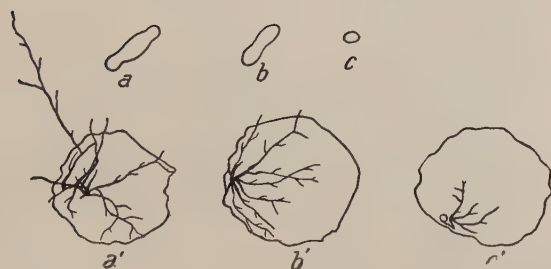
II. In de oorspronkelijke cultuur komen enkele afwijkende cellen voor, die na isolatie zich laten voortkweken. Soms zijn dit zwakke cellen, b.v. abnormaal kleine schimmelsporen, waar-



33



39



40

Pl. 7 (Fig. 38—40).

van het jonge mycelium dan een periode van stilstand of zeer langzamen groei doormaakt, met als resultaat een dwerggras. Soms zijn het geen zwakke cellen, maar onderscheiden ze zich alleen in vorm, samenstelling, dikte van celwand, enz.; het resultaat is een afwijkende cultuur, die echter geenerlei teekenen van zwakte vertoont.

Hieronder volgen eenige gevallen:

1. Dwerggras van *Rhizopus Oryzae*. W. et Pr. G. ¹⁾

Bij de bestudeering van Javaansche raggi trok het mijn aandacht, dat de sporen van *Rhizopus Oryzae* van zoo verschillende grootte waren. Er waren er, in één sporangium, van $5 \times 6\mu$ tot $8 \times 32\mu$ en daartusschen gelegen afmetingen. Ik isoleerde kleine, middensoort en groote, uit één sporangium, op hetzelfde dekglasje. Als voedingsbodem werd gebruikt glucose-pepton van de volgende samenstelling: glucose 5%, pepton $\frac{1}{2}$ %, monokaliumfosfaat $\frac{1}{10}$ %, magnesiumsulfaat $\frac{1}{20}$ %, al of niet met 2 % agar.

De 2 laatste gaven den normalen vorm, de kleinste ontkiemden langzaam en gaven een mycelium, dat altijd in den aanvang klein was. Meestal ontwikkelde dit zich later normaal. In één geval bleef het echter 3 dagen op hetzelfde kleine stadium staan en was het nog levenskrachtig genoeg om te worden overgeënt, waarna het een dwerggras leverde, dat ruim 3 jaren constant is gebleven, totdat het, door verzuim van tijdige overenting, te gronde ging.

Het jonge, pas uit de spore ontstane mycelium, bestond altijd uit zeer dikke hyphen; eerst later ontwikkelden zich dunne draden. Steeds was de grootte van het mycelium evenredig met de grootte van de spore. Zeer duidelijk ziet men dit alles in Fig. 40 en 41, waarin de geïsoleerde sporen en de daaruit ontstane mycelia met gelijke letters zijn aangeduid. Fig. 40 vertoont het geval, waarbij het kleine mycelium (40e', 24 uur oud) zich 24 uur later normaal ontwikkelde tot een mycelium, even krachtig als in Fig. 40a'. Alle culturen, uit deze 5 druppels aangelegd, waren normaal. Fig. 41 betreft echter het merkwaardige geval van het dwerggras. Dit ontstond uit het mycelium van 41c', dat van het begin af langzaam ontkiemde

¹⁾ Schouten. Zeitschr. f. w. Mikr. und f. m. Technik. 1905. XXII. p. 41.

en daarna 3 dagen op hetzelfde stadium bleef staan. De mycelia van 41a' en b' gaven den normalen vorm.

Macroscopisch ziet men, dat de normale vorm geheel de onderste helft van het cultuurbuisje vult, terwijl het dwerg-ras een viltachtige laag van een paar mm dikte vormt.

Microscopisch ziet men bij den normalen vorm de volgende afmetingen: diam. sporangiën $\pm 180 \mu$, dikte der sporangiumdragers $\pm 16 \mu$, sporen $\pm 8 \times 6 \mu$. Bij het dwerg-ras zijn de maten resp. $\pm 70 \mu$, $\pm 8 \mu$ en $\pm 6 \times 4 \mu$.

Bij het laatste is de sporangiumwand bovendien zoo dun, dat ze bij aanraking terstond breekt.

2. Dwerg-ras van *Phycomyces nitens* Agardh. (-vorm). ¹⁾

In het sporangium van dezen schimmel vindt men dikwijls eenige sporen van geheel afwijkende gedaante; terwijl de normale elliptisch zijn, vindt men er ook die langgerekt of in een scherpe bocht gebogen zijn, tot 6 maal zoo lang dan de normale. Geleid door dezelfde gedachte als bij *Rhizopus Oryzae*, isoleerde ik uit één sporangium gewone en abnormale sporen onder hetzelfde glaasje (Fig. 42); de worst-vormige spore no. 2 leverde mij, nadat de ontwikkeling in den cultuurdrupeel normaal was verlopen, op vasten voedingsbodem (glucose-pepton-agar) een dwerg-ras. Vooral op brood, dat voor dezen schimmel een veel betere voedingsbodem bleek, was het verschil met den normalen vorm groot. Om de sporangiën in de gelegenheid te stellen, zich zoo hoog mogelijk te ontwikkelen, werden twee bekerglazen van het hoogste model door middel van een gootvormig verbindingsstuk omgekeerd op elkaar gezet. Door een opening in het verbindingsstuk kon men dan enten; door een andere opening kon men steriel water laten toevloeien om den voedingsbodem vochtig te houden. Een kartonnen, van binnen matzwarte koker liet het licht alleen van boven invallen. Hierin bereikten, op brood, de sporangiën van den normalen vorm een hoogte van 37 cm en het dwerg-ras een van 15 cm (Fig. 43a en b). Ook de sporangiën toonden onderscheid; dat van den dwerg-vorm is meestal door een vochtlaag omgeven en bevat geen sporen, maar een grofkorrelige, vetdruppels-houdende massa.

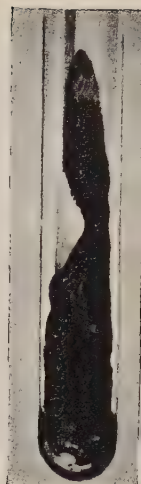
¹⁾ Schouten, *Fol. microbiologica* III. p. 122.



41



44



45



43 A



42



46



43B

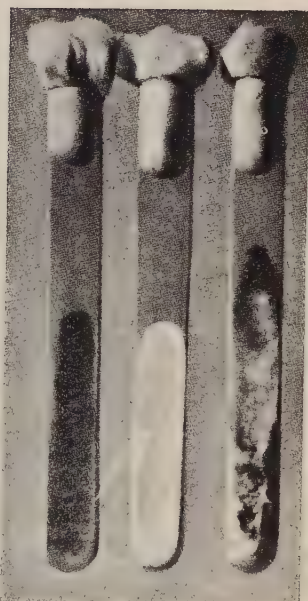


Foto Dr. H. W. Julius

47

Nadat de dwergvorm (*Phycomyces nitens* var. *nana sterilis*) langer dan een jaar was gekweekt, begonnen zich tusschen de steriele sporangiën eenige normale te vertoonen. Dit hangt waarschijnlijk samen met de meerkernigheid der sporen; een der kernen kan de eigenschappen van den stamvorm hebben en een normaal mycelium vormen, dat dan blijkbaar meestal wordt overwoekerd door het dwerggras.

3. Een spruitlooze vorm van *Dematium pullulans* de B. ¹⁾

Bij dezen veel onderzochten schimmel heeft men nooit iets anders waargenomen, dan een wit mycelium, dat conidiën voortbrengt en later, in oudere culturen, zwarte plekken, waarin donkerbruin gekleurde, dikwandige oliehoudende gemmen. (Fig. 44.)

Van een uit de lucht opgevangen stam werden, door isolatie van conidiën, eencelculturen gemaakt. Hetzij men nu uit zulk een cultuur, als ze eenige maanden oud is geworden, op de gewone wijze overent uit een gedeelte waar zich conidiën bevinden, dan wel uit een korstachtige, grootendeels uit gemmen bestaande plek, steeds krijgt men een cultuur, die bestaat uit meer of minder hyphen, die conidiën voortbrengen en later gemmen. Hetzelfde gebeurt ook, als men onder het microscoop één conidie isoleert. Isoleert men echter een gemme, dan kan, door er eene van bepaalde gedaante uit te kiezen, een geheel afwijkende vorm worden verkregen, die bijna zoo hard is als kraakbeen (Fig. 45) en uit een mycelium bestaat, dat, onder welke omstandigheden ook gekweekt, nooit conidiën voortbrengt. 't Bleek, dat de meer isodiametrische bruine cellen over het algemeen den conidiën-vorm leveren, de langwerpige (die, welke minstens 2.5 maal zoo lang zijn als breed) doorgaans den mycelium-vorm (Fig. 46x). Dit deed vermoeden, dat deze cellen afkomstig zouden zijn uit mycelium-draden, waarvan alle cellen in gemmen waren veranderd. Opzettelijk daartoe ondernomen isolatie-proeven, waarbij o.a. lange stukken draad in hun geheel werden geïsoleerd, hebben mij in dit vermoeden bevestigd. Bij deze proeven werden steeds de verschillende typen van bruine cellen onder een en hetzelfde glaasje geïsoleerd, dus onder

¹⁾ Schouten. *Folia microbiologica* III. p. 114.

dezelfde omstandigheden, zoodat invloed van uitwendige factoren was uitgeschakeld.

Pogingen om ook bij andere *Dematium*-stammen dezen conidiën-loozen vorm te verkrijgen, zijn mislukt. Ook heb ik nog gepoogd een verklaring te vinden van een ander merkwaardig verschijnsel: de sterke individueele verschillen in het ontkiemen der conidiën. Men kan daarbij 4 typen onderscheiden: de conidie snoert terstond dochtercellen af, of ze doet dit na zich eerst te hebben ontwikkeld tot een reuzencel, of tot een hyphe of tot een mycelium. Het eerste en het laatste geval, de beide uitersten dus, komen het minste voor. Ik vroeg mij af of hier soms van erfelijkheid sprake kon zijn, die dan in kulturen van duizenden cellen bij elkaar onopgemerkt zou blijven. Dit bleek echter niet het geval. Wanneer men in één druppel verscheidene conidiën, b.v. 10—20 laat ontkiemen, ziet men soms beide uitersten; wanneer men die dan isoleert en elk afzonderlijk kweekt, blijft de nakomeling-schap óók alle typen vertoonen.

Daar het aantal losse bruine, langwerpige cellen in een cultuur zeer gering is, is het duidelijk, dat hier het isoleeren onder het microscoop noodig was, om den mycelium-vorm te ontdekken. Of deze vorm ook in de natuur zelfstandig voorkomt, is moeilijk uit te maken. Misschien is dit zoo; misschien wordt hij in het een of andere laboratorium rein gekweekt, zonder dat men den samenhang met *Dematium* vermoedt. Waarschijnlijk echter wordt hij steeds overwoekerd door den conidiën-vorm, waarin hij min of meer verborgen is. Beide vormen (met en zonder conidiën) heb ik 18 jaar in cultuur gehad.

III. In de oorspronkelijke cultuur ontstaan, macroscopisch zichtbaar, een of meer andere afwijkende groeiwijzen, die zich laten isoleeren en voortkweeken.

Ik vond dit verschijnsel bij verschillende schimmels. Het eerste, hieronder vermelde geval van *Aspergillus Wentii* beschreef ik reeds ¹⁾; de andere hoop ik nog uitvoeriger te werken, zoodat hier alleen een voorloopige mededeeling volgt.

¹⁾ Variabiliteit bij schimmels. Handelingen van het 16e. Ned. Natuur- en Geneesk. Congres 1917. p. 270.

1. *Aspergillus Wentii* Wehmer.

Deze schimmel (op Java gebruikt bij de soja-bereiding) vormt volgens de beschrijving van Wehmer ¹⁾ eerst een geelbruin dek met gewone (2—3 mm) conidiëndragers en later een luchtmycelium met hooge (soms 10 mm) conidiëndragers. Dit laatste is een kenmerk van de soort. In verband met mijn ervaring bij andere schimmels, vermoedde ik, dat ik 2 verschillende vormen zou krijgen, als ik conidiën isoleerde van de lage conidiëndragers en van de hooge. En dit bleek werkelijk het geval te zijn. Van de lage isoleerend, krijgt men een vorm, die van den aanvang af hoofdzakelijk bruin opkomt en 't niet verder brengt dan tot het geelbruine lage dek. Van de hooge isoleerend, een vorm, die van den aanvang af witvlokkig opkomt, tusschen het wit plekken van lage conidiëndragers vertoont en later, soms eerst na verscheidene weken, een luchtmycelium met hooge conidiëndragers voortbrengt. Deze vorm lijkt wel wat op den oorspronkelijken, door Wehmer beschreven; een vorm, die er volkomen op lijkt, krijgt men als men een mengcultuur aanlegt van beide. 't Is duidelijk waarom men dit merkwaardige feit niet eerder heeft ontdekt. De meeste onderzoekers hebben waarschijnlijk altijd overgeënt uit het onderste deel van de cultuur, bij een kolf b.v. uit het dek; in dit geval ent men eigenlijk een mengsel van beide conidiën-soorten over, daar de hooger groeiende op de lagere vallen. Entte men al eens in enkele gevallen alleen uit het luchtmycelium over, dan kreeg men toch een vorm, die nogal veel lijkt op den oorspronkelijken.

De lage vorm vertoont een lichter gekleurd en ijl gedeelte aan de bovenste grens van de cultuur; ent men daaruit conidiën over, dan krijgt men een witte cultuur.

Bovengenoemde 3 vormen (laag-bruin, laag-wit en hoog, zie Fig 47) heb ik nu 18 jaar in cultuur.

2. *Achorion Schönleinii* Remak.

De Favusschimmel is door zijn haast onbegrensde polymorphie in staat den onderzoeker veel moeite te bezorgen. Is 't

¹⁾ Mémoires de la Soc. de Phys. et d'Hist. nat. de Genève. Bd. 33, 2e ged. no. 4. 1901.

één soort? Wij willen deze vraag liever laten rusten, maar er thans alleen op wijzen, dat men van één spore uitgaande, een sterke polymorphie ontdekt, waarbij de soms zeer uiteenlopende vormen hun karakter erfelijk behouden. Een voorbeeld zien we in Fig. 48.

I. is de stamvorm in varieerenden toestand, n.l. met bruine gladde, witte en bruine opengebarsten opzwellingen.

II. is geënt uit I en vertoont (in de fig. minder duidelijk!) een geheel ander beeld, n.l. de bekende donsachtige vlokken („duvet blanc” van S a b o u r a u d). Voor de foto genomen werd, was er nog een witte opzwellling, die later verdween.

III. is afkomstig uit deze witte opzwellling. De zeer afwijkende kratervorm zou menigeen er toe brengen deze cultuur als een afzonderlijk ras of soort „crateriforme” te beschouwen.

IV. is afkomstig uit de witte vlok van een tweede overenting van II.

Had men het materiaal op de gewone wijze bewerkt, b.v. door fijnwrijven met glaspoeder en uitzaaien op een plaat, dan zou ieder de conclusie getrokken hebben, dat men met verschillende soorten te doen had. De eencelcultuur sluit deze mogelijkheid echter uit en doet tevens de vraag rijzen, of volgens deze methode de systematiek der dermatomycosen niet nog eens moet worden herzien.

Favusmateriaal geeft sporen van zeer verschillenden vorm. (Fig. 49.) Daar 't mij meer dan eens (zie boven) gelukt was uit een afwijkenden sporevorm een blijvend afwijkend ras te verkrijgen, besloot ik dat ook hier te beproeven. Inderdaad ziet men, dat zoowel de dekglas- als de buisculturen zeer sterk verschillen kunnen wat het voortbrengen van endoconidiën betreft en dat dit verschil zelfs enkele maanden blijft. Na 6 maanden was het echter geheel verdwenen. Dat hier van bepaalde regels geen sprake was en men derhalve zeer voorzichtig moet zijn in het trekken van conclusies, moge uit het volgende blijken: De sporen Fig. 49a en c gaven op het dekglas na 10 dagen nog geen enkele endoconidie; de rand van de buiscultuur vertoonde ze na 7 weken evenmin. Spore Fig. 50b gaf op *hetzelfde* dekglas een mycelium, dat terstond vol zat met endoconidiën, die in den rand van de buiscultuur

na 7 weken ook overvloedig voorkwamen. Bij een volgende proef leverde echter een spore van den vorm b een mycelium geheel zonder conidiën.

3. *Trichophyton* sp.

Bij een *Trichophyton*-stam was de polymorphie misschien nog sterker. Men ziet het resultaat in Fig. 50.

I. is de oorspronkelijke cultuur, ontstaan uit één cel, oppervlakte poederachtig. Na eenige weken secundaire vlokken, die echter niet alle, zooals van *Favus*, donsachtig zijn. Uit het primaire deel van de cultuur, dus niet uit de vlokken, werd overgeënt in II. die, merkwaardig genoeg, in tegenstelling met I., zeer duidelijk den kratervorm vertoont en bij microscopisch onderzoek ook het beeld vertoont van *Trich. crateriforme*. Uit een donsachtige vlok van I. werd overgeënt in III., die een geheel nieuwen vorm vertoont, n.l. met een glimmenden zoom. Zonder dien zoom lijkt III. op den gewonen donsform van *Trich. crateriforme*, zooals *S a b o u r a u d* dien beschrijft. ¹⁾ Uit een fluweelachtige vlek van I. werd overgeënt in IV., die een oppervlakte gaf als van III., maar zonder glimmenden zoom en zonder straalsgewijs verlopende plooien. Microscopisch alleen sterk vertakte steriele hyphen.

Bovendien traden in enkele eencelculturen nog zeer harde kraakbeenachtige plekken op van ± 2 mm diam., die uit de gewone elementen van den stamvorm bleken te bestaan. Na isolatie leverden ze ook den stamvorm.

Evenals bij *Favus*materiaal werd ook hier nog nagegaan of sporen van verschillenden vorm verschillende culturen zouden leveren; echter zonder resultaat.

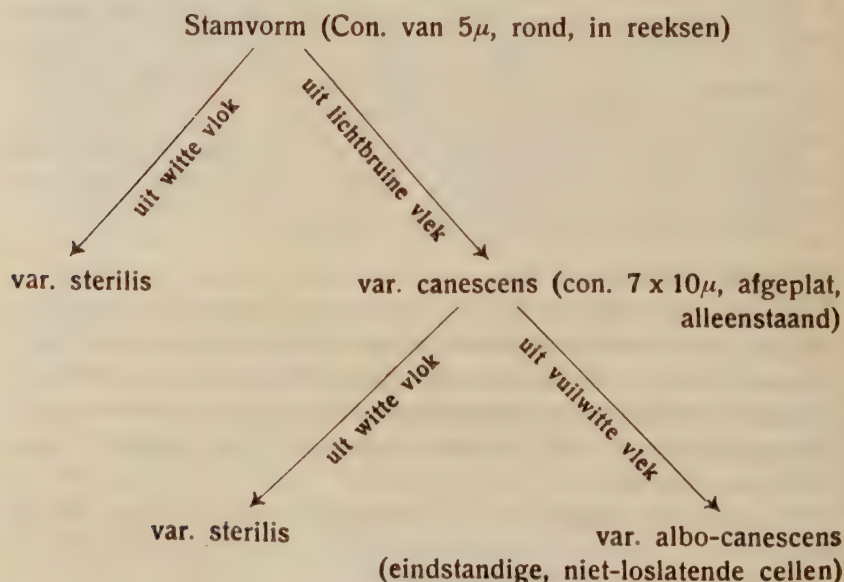
4. *Torula* sp. I.

Ik durf nog niet te zeggen, of ik, wat dit geslacht betreft, met reeds bekende soorten te doen heb gehad. Misschien zal mij dit nooit duidelijk worden, want *Torula* vormt een labyrinth, waar men niet gemakkelijk uitkomt. In deze voorloopige mededeeling wil ik slechts aantonen, hoe variabel deze schimmels zijn.

Torula sp. I ving ik op in aardappel-voedingsbodem. In de

¹⁾ *S a b o u r a u d*, *Les teignes*, Fig. 101.

donkerbruine eencelculturen zag ik bijna altijd witte vlokken ontstaan. Een enkele maal ontstonden deze niet. Dat dan de eigenschap om ze voort te brengen toch niet was verloren gegaan, bleek wel als ik uit zulk een cultuur weer eencelculturen aanlegde; deze kregen dan weer vlokken. Terwijl de stamvorm reeksen van bruine conidiën voortbrengt van 5μ diam. (Fig. 51), bleek de witte alleen uit hyphen te bestaan (var. *sterilis*). De stamvorm brengt bovendien nog lage, grijsbruine plekken voort, die ook conidiën bevatten, maar alleenstaande van $\pm 7 \times 10\mu$ en afgeplat (Fig. 52). Wanneer men deze met de entnaald afkrabt, loopt men groot gevaar ook die van den stamvorm mee te nemen. Ze werden dus onder het microscoop geïsoleerd en gaven een grijsbruinen, los-korreligen vorm (var. *canescens*). Deze vorm brengt weer vlokken voort van var. *sterilis*, maar bovendien vuilwitte, duidelijk hiervan verschillende vlokken. In deze vindt men aan het einde van de hyphen conidiënachtige cellen, die echter niet loslaten, wat met de conidiën van var. *canescens* wel het geval is (var. *albocanescens*; Fig. 53). Al deze vormen (Fig. 54) bleken constant op verschillende voedingsbodems; ruim 20 jaar zijn ze constant gebleven op glucose-pepton-agar. Het volgend schema maakt den samenhang duidelijk:





48



50



a

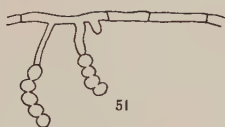


b

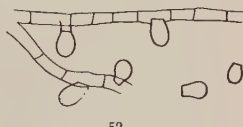


c

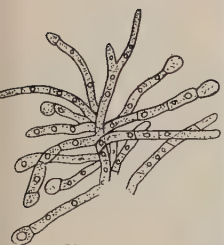
49



51



52



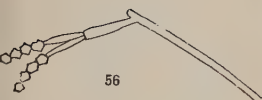
53



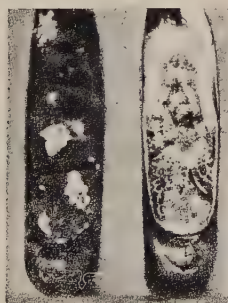
54



55



56



58



57

Pl. 9 (Fig. 48—58).

5. *Torula* sp. II.

Deze *Torula*-vorm toonde nog sterker variabiliteit. Alle variaties beschrijven zou te ver voeren; ik wijs daarom alleen op het volgende:

't Uitgangspunt was een vuil-witte sector in een bruine kolonie. Van geïsoleerde witte hyphen gaven sommige op brood een droog-korrelige, andere een gelei-achtig gerimpelde cultuur, beide zonder conidiën. De gelei-achtige leverde weer, op volkomen denzelfden voedingsbodem, twee culturen: een donkerbruine en een zeer lichtbruine, beide zonder conidiën. Gedurende 1½ jaar heb ik den conidiën-loozen vorm aangehouden; hij bleef constant.

Terecht noemt S a c c a r d o (Sylloge IV) het geslacht *Torula* een „genus in posterum accuratius revidendum et forte dividendum”. Zonder ééncelculturen zal dit echter niet gaan!

6. *Penicillium* sp.

Eencilculturen van *P.* vertoonden in buisculturen (glucose-pepton¹⁾-agar) en in kolfculturen (glucose-pepton) witte plekken, die niet alleen uit hyphen bestonden, maar waarin ook conidiën gevormd werden. Uit deze plekken werden conidiën geïsoleerd, zoodat een serie van buisculturen en een serie van kolfculturen ontstond. Beide weken (de buisculturen het sterkst) duidelijk af van den stamvorm. Wij zullen ze buisvariant en kolfvariant noemen. Terwijl de conidiëndragers bij den stamvorm in dekglasculturen na 3 dagen ontstonden, ontwikkelden die van de kolfvariant in dekglasculturen zich in geringer aantal na 12 dagen; die van de buisvariant in dekglasculturen na 20 dagen. De conidiëndragers zelf waren ook minder ontwikkeld en de conidiën hoekig i.p.v. rond (zie Fig. 55 en 56). Macroscopisch bleven de varianten zich onderscheiden door de witte kleur, in het begin der ontwikkeling met gelen zoom (kolfvariant) of roodgele vlammen (buisvariant). Ook ontbrak de typische *Penicillium*-geur, of was deze zwakker. Verder bleek de witte vorm krachtiger van groei; gelijktijdig met den stamvorm op een plaat geënt, werd de laatste overwoekerd. Na 7 maanden vertoonden zich in 2 buisculturen van resp. 7 en 4 weken oud voor het eerst

¹⁾ Zie p. 255.

plekken van terugslag, die altijd weer overwoekerd werden, maar waaruit ik toch den oorspronkelijken vorm kon isoleeren.

Op allerlei voedingsbodems (kokosnoot, banaan, brood, gist-extract + glucose, mout), in massa-culturen (glucose-pepton in groote Erlemeyer-kolven) en ook op sterk zure en alkalische voedingsbodems behield de variant in hoofdzaak zijn afwijkend karakter.

7. *Cladosporium herbarum* Link.

Van dezen schimmel, die volgens J a n c z e w s k i ¹⁾ zeer variabel is wat de afmetingen van het mycelium en den vorm der conidiën betreft, isoleerde ik uit een vorm met ééncellige conidiën een aantal eencelculturen, die alle een olijkleurige, grof-fluweelachtige cultuur gaven, waarin na eenige weken grijze plekken ontstonden. Deze bleken, in tegenstelling met den stamvorm, te bestaan uit enkel hyphen, die in jeugdigen toestand wit zijn en later bruin worden en waarvan een gedeelte later, ongeveer na 4 weken, uiteenvalt in langgerekte stukken (Fig. 57). Deze stukken, geïsoleerd, gaven steeds weer denzelfden sterielen vorm. Macroscopisch onderscheidt hij zich door de grijze kleur, dikwijls met zwarte vlekken en straalsgewijs verloopende diepe plooiën. Gedurende bijna 20 jaar is deze vorm nu constant (Fig. 58. Links normaal, rechts steriele vorm.)

8. *Trichothecium roseum* Link.

Deze bekende schimmel (Fig. 59) vertoonde, als eencelcultuur gekweekt, in de rose cultuur na eenigen tijd donkerroode kogeltjes. Deze bleken te bestaan uit vertakte conidiëndragers, die een ontzettende massa in slijm liggende zeer kleine conidiën ($2\frac{1}{2} \times 1\frac{1}{2} \mu$) voortbrachten. (Fig. 60 ²⁾). Ik ontdekte, dat M a t r u c h o t ³⁾ dezen vorm reeds waargenomen en er den naam *T.ros.var. pseudoverticillium* aan gegeven had. Later ontstaan in de culturen van ps.vert. ook weer de gewone conidiëndragers van *Trich.roseum*, die, na vele overentingen, ten slotte de pseudo-vert. geheel overwoekert.

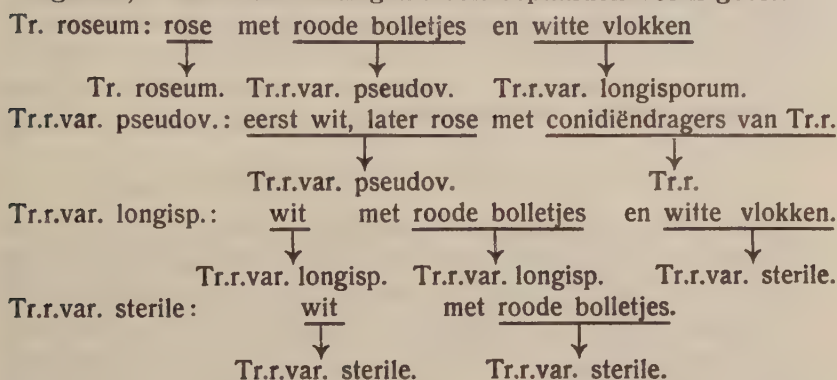
¹⁾ Anzeiger der Akad. d. Wiss. in Krakau 1894, S. 187.

²⁾ Ter vergelijking ook een conidie van *Tr. roseum*.

³⁾ Recherches sur le développement de quelques mucédinées. Paris, Armand Colin & Cie. 1892.

Bovendien ontstaan in *Trich.roseum* witte vlokken, bestaande uit hyphen met lange conidiën (Fig. 61). Isoleert men deze, dan krijgt men licht-rose, bijna witte, vlokkige, fluweelachtige culturen, die vooral als ze ouder zijn, zeer lange conidiën ($\pm 20 \times 5 \mu$) voortbrengen. Ik noemde dezen vorm *Trich.roseum* var.*longisporum*. Deze brengt eveneens roode kogeltjes met conidiën voort, die, geïsoleerd, echter weer den *longisporum*-vorm leveren. Hij brengt ook witte vlokken voort, uit conidiën-looze hyphen bestaande: *Trich.roseum* var.*sterilis*. Ook deze brengt roode kogeltjes voort, alleen uit hyphen bestaande. Geïsoleerd door afsnijden der hyphen leveren deze weer de variëteit *sterilis*. De eigenschap om roode bolletjes voort te brengen schijnt dus wel inhaerent te zijn bij dezen schimmel.

Hieronder volgt een schema, waarin met een pijl is aangegeven, wat de overenting uit een bepaalden vorm geeft:



't Is wel duidelijk, dat voor het uiteenpluizen van al deze vormen de micromanipulator noodig is. De plaatcultuur levert te veel gevaar, dat de vormen elkaar overwoekeren; deze liet M a t r u c h o t zelfs in den steek toen hij zijn var. *pseudoverticillium* wilde isoleeren.¹⁾

In de 8 gevallen, die ik hierboven beschreef, werd de P_H van den voedingsbodem niet telkens bepaald. Daar de bereiding altijd was toevertrouwd aan denzelfden persoon, die steeds dezelfde methode volgde, werd het onderzoek met lakmoes voldoende geacht.²⁾ Bovendien werden alle stamvormen en alle

¹⁾ l.c. p. 14.

²⁾ De thans gebruikelijke P_H -bepaling was 20 jaar geleden, toen ik deze proeven deed, ook vrijwel onbekend.

varianten zoowel op extra zuren als op alkalischen voedingsbodem gekweekt, zonder dat er verschil in groeiwijze werd waargenomen, waaruit wel mag worden afgeleid, dat de zuurgraad blijkbaar niet van invloed is.

Hoe moet men in deze 8 gevallen de afwijkende vormen opvatten? Het antwoord is niet zoo gemakkelijk te geven. De nieuwe vormen treden alle op in den gewonen voedingsbodem; ze kunnen dus het gevolg zijn van de inwerking van stofwisselingsproducten of van voedselgebrek, dus van natuurlijke factoren. Wellicht moeten we er orgaanvorming in zien, waarbij men de nieuw ontstane organen, dank zij de eenvoudige bestaansvoorwaarden bij lagere organismen, afzonderlijk verder kan kweken. De meeste onderzochte schimmels zijn gewone objecten van onderzoek, terwijl men er maar één voorkomingswijze van kende. Uit deze proeven blijkt dus wel duidelijk, dat de begrenzing der soorten bij de lagere organismen nog niet zoo vast staat als over 't algemeen wordt aangenomen.

B. *Physiologische onderzoekingen.*

1. Voedingsphysiologie van Saprolegniaceen.

Deze komen, als typische saprophyten, meestal voor in een omgeving, die zeer rijk is aan bacteriën. Daar dus zoowel het mycelium als de sporen doorgaans met bacteriën bezet zijn, is de methode van de plaatcultuur, ter verkrijging van een reïncultuur, minder gewenscht. Niet moeilijk is het echter om zwerm-sporen, die kort geleden zijn uitgestooten, vóór ze met bacteriën bezet zijn, op te vangen en daarvan te isoleeren. Men spoelt daartoe een meelworm, die men op slootwater heeft laten drijven en nu dicht bezet is met een sporangiëndragend mycelium, uit in phys.NaCl en legt die dan in dezelfde vloeistof in een bakje van geringen diam. Na korten tijd zal men op de oppervlakte een menigte zwemsporen vinden; een paar druppels, met een entoog opgenomen, kunnen dan het uitgangspunt vormen van de isolatie onder het microscoop. Op die wijze heb ik ¹⁾ zwersporen geïsoleerd van *Achlya* sp. en deze schimmel verder gekweekt op erwten-decoct, meelwormvoedingsbodem, glucosepepton, Löffler-

¹⁾ Zie een en ander uitvoeriger in S. L. Schouten, Reinkulturen uit één onder het mikroskoop geïsoleerde cel. Proefschrift 1901. p. 55 e.v.

bouillon, kippeneiwit en rijst. Omdat van de voedingsphysiologie der Saprolegniaceeën weinig bekend was, heb ik daarvan een en ander onderzocht. De raadgevingen, die ik destijds daarbij mocht ontvangen van wijlen Prof W e n t, gedenk ik hier met erkentelijkheid.

Het volgende is mij bij dit onderzoek gebleken:

Bij glucose als C-voedsel, is pepton het beste N-voedsel; veel minder goed is, in afnemende volgorde, amm.sulfaat, asparagine, ureum en kal.nitraat. Bij amm.sulfaat als N-voedsel is aardappelmeel het beste C-voedsel; dan komen, in afnemende volgorde, maltose, melksuiker, glucose, laevulose en saccharose. Pepton is zoowel C- als N-voedsel. Bij anaërobe cultuur wordt alcohol gevormd. Bij voeding met glucose-pepton ontstaan zuren. De schimmel scheidt een tryptischenzym af. Een vetsplitsend enzym wordt niet afgescheiden; Arachis-olie, door andere schimmels wél opgenomen, wordt door *Achlya* niet als voedsel gebruikt. Zetmeel wordt door een amylolytisch enzym omgezet in dextrine en daarna in glucose. De laatstgenoemde feiten wijzen niet — gelijk dat dikwijls wordt aangenomen — op een bijzondere voorliefde voor dierlijke substraten.

2. Digestie bij Protozoën.

Van de voedingsphysiologie der Protozoën weten wij betrekkelijk weinig. R u d. O e h l e r, een der beste onderzoekers uit den laatsten tijd, beweert zelfs kortweg ¹⁾, dat wij geen psychiologie der eencelligen hebben, omdat wij moeite hebben met het maken van reinculturen. Daarom weten wij b.v. niet wat verteerd wordt en wat onverteerd blijft; ook niet, welke bacteriën, wanneer deze als voedsel worden gebruikt, door hun stofwisselingsproducten een schadelijken invloed uitoefenen. En toch is 't onderzoek hiervan, o.a. voor de kennis van de zelfreiniging van water, hoog noodig.

Tot nog toe heeft men getracht reinculturen met één begeleidende bacteriesoort te krijgen, o.a. door herhaald uitwasschen, centrifugeeren en uitgieten op vaste voedingsbodems; door uit te gaan van cysten, die met water of soda-oplossing van vastzittende bacteriën worden gereinigd; door middel van den electrischen stroom, waarbij ze naar de kathode gelokt worden; door

¹⁾ Arch. f. Protistenkunde, 1924, p. 288.

te enten in het midden van een agarplaat, die van te voren geheel met een reincultuur van een bacterie is bezet, om dan de snel naar den omtrek zich bewegende protozoën, na herhaling van deze epting, tenslotte in gezelschap van die eene bacterie te krijgen.

De resultaten van al deze pogingen zijn echter niet schitterend. Oehler, die er zich vele jaren bijzonder op heeft toegelegd, komt tot de conclusie: Gewiss müssen andere, bessere Verfahren ausgearbeitet werden um Sterilzuchten zu erreichen".

Ik heb gemeend hier den micromanipulator te moeten gebruiken. De druppels op het dekglas worden aangebracht volgens Fig. 32. Physiol. keukenzout wordt liefst niet gebruikt, omdat veel infusoriën dat niet kunnen verdragen; ze rollen er eenigen tijd in rond, terwijl ze inkrimpen, en zijn spoedig dood. In de Fig. is dr. 3 dus de materiaaldrappel, de andere druppels zijn hooiextract ($2\frac{1}{2}\%$ hooi op water). Het isoleeren uit den materiaaldrappel gaat op de wijze, zooals die is beschreven op pag. 234. Als het alleen te doen is om de cultuur der protozoën, onverschillig welke bacteriën er bij zijn, worden ze terstond gebracht in den drappel, waarin ze zich moeten vermenigvuldigen. Wil men echter de protozoën kweken met doode bacteriën of met één bacteriesoort in reincultuur, dan worden ze uit den eersten drappel overgebracht in een tweeden, daarna in een derden, enz. In elk van die druppels blijven ze een tijd rondzwemmen om van begeleidende (niet van vastzittende!) bacteriën te worden bevrijd. De ervaring wijst hier uit, hoeveel druppels ze moeten passeeren. Tenslotte laat men ze in den laatsten drappel zich vermenigvuldigen, nadat men daaraan de bacteriën (bij den aanvang op het glaasje gedeponeed) heeft toegevoegd. Doorgaans kan men dan na eenige dagen overenten in een cultuurbuisje. Tenslotte volgt de contrôle, hierin bestaande, dat men een drappel der cultuur brengt in bouillon. Bij voeding met doode bacteriën moet die helder blijven; bij voeding met levende reincultuur mag alleen de bacterie in kwestie op een Koch'sche plaat opkomen.

Nadat ik op deze wijze diverse reinculturen had verkregen, koos ik er een van *Colpidium campylum* uit om proeven te nemen over de snelheid van digestie.

Op een dekglas werden de protozoën gebracht, met een serie spoeldruppels van hooi-extract en bovendien enkele druppels

bouillon of bouillon-gelatine. Ook werd een klompje van een bacillen-reincultuur, waarvan ik de verteerbaarheid wilde nagaan, tusschen de druppels afgezet.

Nadat de protozoën verschillende druppels waren gepasseerd, liet ik ze ten slotte in een druppel gedurende enkele uren vasten. Had ik met sterke vergrooing geconstateerd, dat ze geen gevulde voedingsvacuolen meer bevatten (tot dit doel werden ze even uit den druppel getrokken en in een kleineren druppel onderzocht (zie Fig. 62 en 63), dan werden ze gevoerd. Na verschillende tijden werden ze met een snijnaald geopend (Fig. 64), zoodat de geheel gevulde vacuolen vrij kwamen (Fig. 65). Deze werden stuk gedrukt, waarna de bacteriën, na afspoeling, aan den rand van de bouillon- of bouillon-gelatinedruppels werden afgezet. Hier kon men dan aan de vermenigvuldiging zien of ze nog leefden.

Bij deze proeven bleek allereerst, dat Colpidium, zoolang hij weinig bacteriën tegenkomt, deze negeert, maar energisch aan het eten gaat, als hij ze in groote massa op zijn weg ontmoet, vooral als 't een dikke prop is, waar hij zich inboort. Hij maakt dan door zijn snel ronddraaiende bewegingen den indruk, alsof hij in een soort verslindingsroes geraakt, waardoor in weinige minuten 3 of meer vacuolen, gevuld met bacteriën, te zien zijn.

Bij het afzonderlijk onderzoek der vacuolen was het niet moeilijk de bacteriën over verschillende druppels te verdeelen en te tellen. Zoo telde ik 127 sporen van een soort hooibacil en in een kleine voedingsvacuole 64 typhusbacteriën; in één keer kunnen er dus gemakkelijk 500—800 bacteriën worden opgenomen.

Over den wand der voedingsvacuolen bestaan verschillende meeningen; meestal wordt die opgevat als een differentiatie van het entoplasma, ontstaan door samenkomen van plasma en water, dat tegelijk met het voedsel wordt opgenomen, waarbij oppervlaktewerking en colloïd-chemische factoren een rol spelen. ¹⁾ Met de puntnaald kon ik gemakkelijk constateeren, dat die wand betrekkelijk taai is; aan den eenen kant kon ik een gaatje prikken en als er dan aan de tegenovergestelde zijde geduwd werd, bleef de wand bestaan en zag men de bacteriën na elkaar uit de opening komen.

Eenig denkbeeld over de snelheid van digestie gaven de vol-

¹⁾ Zie o.a. Bozler, Arch. f. Protistenkunde, 1924, p. 163.

gende proeven. Een niet nader gedetermineerde subtilisachtige bacterie werd zeer gaarne door onze Colpidium als voedsel gebruikt. De voeding zelf duurde 5 minuten. Werden de bacteriën 10 minuten daarna op de bovenbeschreven wijze uitgezaaid, dan kwamen ze niet op; geschiedde dit 5 minuten na afloop van de voeding, dan bleken ze nog levend. Gelijk te verwachten was, hielden sporen van deze bacterie het veel langer in de vacuolen uit. Wanneer ik Colpidium na de voeding nog 30 minuten liet leven, daarna de vacuolen uitsneed, deze 15 minuten intact liet liggen en daarna de sporen entte, bleken ze alle nog kiemkrachtig. Zelfs zag ik, dat ontkieming nog mogelijk was als bovengenoemde perioden van 30 en 15 minuten werden opgevoerd tot resp. 90 en 60 minuten. Onder bepaalde omstandigheden worden geheel gevulde vacuolen uitgestooten; wanneer ik daaruit den volgenden dag de sporen uitzaaide, bleken ze nog levenskrachtig.

Nog werden er proeven genomen met Anthrax, Coli en Typhus. Anthrax werd als bacterie niet gegeten, blijkbaar omdat de afmeting te groot is; de sporen daarentegen werden wel opgenomen. Coli en Typhus bleken veel meer resistent dan de subtilisachtige bacteriën. Colibacteriën liet ik eens 40 minuten na de voeding in de levende Colpidiën; daarna werden de vacuolen uitgesneden en het preparaat in de ijskast gezet. Na 19 uur werd de vacuolenwand verbroken en bleken de bacteriën nog levend. Typhusbacteriën bleken nog niet afgestorven, na een verblijf van 40 minuten in de levende Colpidiën.

3. Ouderdomsverzwakking bij gistcellen.

Door medici is de vraag gesteld, in hoeverre de leeftijd der ouders van invloed kan zijn op de gesteldheid van het kind, in hoeverre dus het laatste kind uit een huwelijk, geboren toen de ouders op hooger leeftijd waren, reeds daardoor alleen in ongunstiger conditie zou verkeeren dan de eerstgeborene. 't Mag niemand bevreemden dat de microbioloog deze kwestie eens nagaat bij microörganismen, waarbij ze zeker gemakkelijker te onderzoeken is, zoowel door het ontbreken — althans in de meeste gevallen — van den factor der copulatie, als door de eenvoudige en snel tot een resultaat voerende kweekmethoden. Bacteriën vormen daartoe geen geschikt materiaal; het individu deelt zich hier éénmaal, waarmede zijn bestaan als zoodanig is

geëindigd. Bij gist staat de zaak anders; hier brengt de cel op jeugdigen leeftijd knoppen voort en doorgaans ook daarna, als ze ouder is. Een denkbeeld van dit proces geeft ons Fig. 66, waarbij door cijfers de volgorde is weergegeven, waarin de cellen ontstaan.

Nu liggen de volgende vragen voor de hand:

- 1e. zal 5 even snel volwassen zijn als 1; zal dus van beide de generatieduur even groot zijn?
- 2e. zal er verschil zijn in levensvatbaarheid tusschen 5 en 1?
- 3e. zal de nakomelingschap van 5 even snel groeien als die van 1?
- 4e. indien het verschil, sub 3 genoemd, bestaat, zal dit dan over langeren tijd erfelijk zijn?
- 5e. hoe lang gaat een gistcel door met afsnoeren, dus hoe lang duurt het generatievermogen?

Dit alles kan alleen worden opgelost door individueele behandeling van de gistcel. Een cel moet geïsoleerd worden in een druppel van een voedingsvloei-stof. Heeft ze hierin eenigen tijd afgesnoerd, dan moet ze in een nieuwen druppel worden overgebracht, ten eerste omdat anders door een te groot aantal cellen de verdere waarneming verhinderd wordt; ten tweede omdat de moedercel én de afgesnoerde cellen alle afzonderlijk op hun levensvatbaarheid moeten worden gecontroleerd; ten derde omdat de schadelijke invloed van stofwisselingsproducten voortdurend moet worden geëlimineerd.

Bij deze proeven moet men de jonge cel gemakkelijk kunnen herkennen te midden van de oudere. Een rose gistsoort, opgevangen uit de lucht, leende zich uitstekend tot het onderzoek door de omstandigheid, dat sommige cellen na 2 dagen een uitlooper vormen. Aan dezen uitlooper ontstaat later een spore, die weggeslingerd wordt, waarom K l u y v e r en v a n N i e l, die dit slingermechanisme nader onderzochten, aan dit organisme den naam *Sporobolomyces* gaven. Het isoleeren van deze cellen en de verdere waarneming had plaats op een dekglasje, waarop in regelmatige rijen 100—150 druppels van $\pm 0,25$ mm diam. waren afgezet (Fig. 67). Deze zijn groot genoeg om een flinke ontwikkeling toe te laten, zonder dat de cellen last hebben van schadelijke stofwisselingsproducten; men ziet er b.v. een gistcel in korten tijd zich tot ± 300 cellen in vermenigvuldigen.

Als voedingsvloei-stof werd eerst ook hier weer gebruikt glucose-pepton; beter beviel mij echter de voedingsbodem, die *Plaut* aangeeft voor de schimmels der dermatomycosen, n.l. glucose 1%, pepton 1—2%, glycerine $\frac{1}{2}\%$, chl.natr. $\frac{1}{2}\%$ (alkalisch).

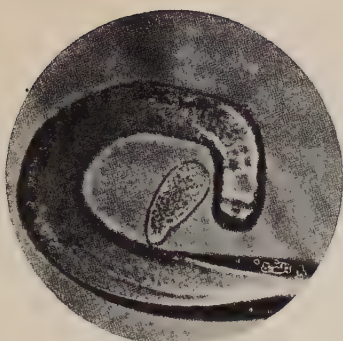
Ik heb van vele cellen en hun nakomelingen generatieduur en generatievermogen nagegaan. Een enkel voorbeeld moge vol-doende zijn om een denkbeeld te geven van den gang van het onderzoek en de resultaten.

- 22 Mrt. 7.30 Gewone cel geïsoleerd.
- 23 Mrt. 22.— Uit de hieruit ontwikkelde kolonie cel A met uit-looper geïsoleerd (Fig. 68).
- 24 Mrt. 12.— A met ongeveer 25 losse cellen. A overgebracht in nieuwen druppel.
- 25 Mrt. 9.— A met ongeveer 25 losse cellen. A overgebracht in nieuwen druppel.
- 25 Mrt. 22.— A met 44 losse cellen. In 13 uur dus 44 cellen. Aan A zelf zitten nog 2 groote knoppen vast. A met de knoppen overgebracht in nieuwen druppel. (Fig. 69).
- 26 Mrt. 11.— In 13 uur 2 cellen er bij, nog vastzittend (Fig. 70). Generatieduur dus sterk vergroot.
- 26 Mrt. 20.— In 9 uur één knop er bij (Fig. 71).
- 27 Mrt. 10.— In 14 uur 2 cellen er bij (Fig. 72).
- 27 Mrt. 22.— Slechts één knop (Fig. 72x) er bij. De generatie-duur is dus nog steeds groot; een loslaten en zelf-standig worden van de jonge cellen, zooals in de eerste dagen, heeft blijkbaar niet gemakkelijk plaats.
- 28 Mrt. 12.— 15 cellen. Eerst nu, dus na 49 uur, heeft de linker onderste cel (Fig. 72xx) losgelaten van de moeder-cel.
- 29 Mrt. 11.— 33 cellen. In 23 uur hebben 15 cellen zich slechts tot 33 kunnen vermenigvuldigen. Hieruit blijkt wel de voortgaande verlenging van den generatie-duur. Daarna ging de vermenigvuldiging in het-zelfde tempo voort.
- 31 Mrt. Uit den druppel werd op agar geënt.

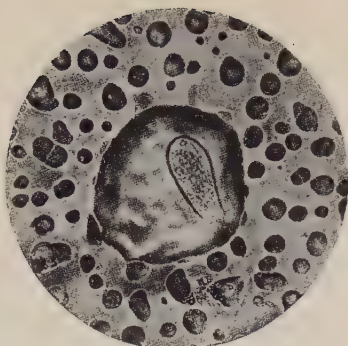
Na 6 dagen was er met de loupe nog geen opkomst te zien;



59



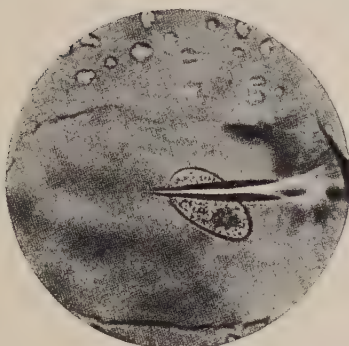
62



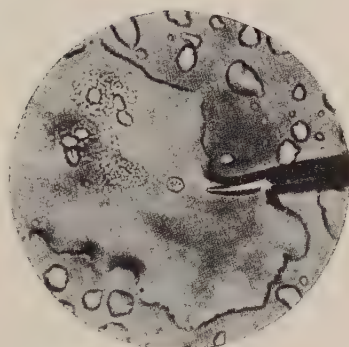
63



60



64



65



61



68



69



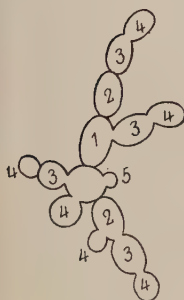
70



71



72



66



67



73



Pl. 10 (Fig. 59—73).

eerst daarna ontwikkelde de cultuur zich langzaam. In dit geval bleek de ouderdomsverzwakking, althans voor eenigen tijd, ook erfelijk. Want na 11 weken, bij de 6e overenting, vertoonde een 3 dagen oude streepcultuur van den senielen vorm nog een groot verschil met een even oude van den normalen vorm (Fig. 73); beide culturen waren aangelegd met een entoog, gevuld met een even dichte cellen-suspensie. Bij de 18e overenting, na $17\frac{1}{2}$ maand, was het verschil nog duidelijker; daarna is het minder geworden en 4 maanden later was het vrijwel verdwenen. Een gewone modificatie, die doorgaans even snel terugslaat als ze ontstaan is, is dit dus niet geweest. Men kan 't beschouwen als een langdurende modificatie („Dauermodification”).

Wat de in den aanvang gestelde vragen betreft, kunnen we dus zeggen, dat van de laatst afgesnoerde cellen de generatieduur veel grooter is; dat de generatieduur der knoppen, die zij voortbrengen, ook veel grooter is en dat, in verband daarmee, de groei der geheele nakomelingschap veel minder krachtig is; tenslotte, dat deze ouderdomsverzwakking $1\frac{1}{2}$ jaar duidelijk bleef. Uit allerlei andere experimenten, op soortgelijke wijze ondernomen, bleek nog, dat de duur van het generatie-vermogen van verschillende cellen zeer wisselde; bij sommige was het na $1\frac{1}{2}$ dag afgelopen, bij andere eerst na 10 dagen.

Een microscopisch verschil tusschen de cellen van den normalen en van den senielen vorm heb ik niet kunnen constateeren; hoe langzaam de laatste ook opkwam, de cellen zelf schenen gezond.

4. Infectie-proeven met één of enkele bacillen.

Het vraagstuk van de filtreerbaarheid van het tuberculose-virus is nog onopgelost. Ook ten aanzien van de t.b.c.-bacil betwijfelt men, of de tot nu toe bekende vorm de eenige is, waarin dit microörganisme voorkomt. Zoo hebben B e z a n ç o n en P h i l i b e r t ¹⁾ de jonge vliesjes van glycerine-bouillon-culturen onderzocht en daarin, behalve t.b.c.-bacillen, een netwerk geconstateerd, dat zich met methyleenblauw kleurt en zeer kleine granula, die ten deele binnen, ten deele buiten de bac-

¹⁾ Presse méd. 34, 34.

teriën liggen. Zij — en anderen — onderstellen nu, dat de t.b.c.-bacil, behalve in den vorm van het bekende staafje, ook in een amorph stadium (netwerk) en als granula voorkomt. Volgens verschillende onderzoekers zou zich bij cavia's, die geïnfecteerd zijn met het bacillenvrije filtraat, dat dus alleen de laatst genoemde elementen bevat, een atypische tuberculose ontwikkelen, die gekenmerkt is o.a. door het ontbreken van de echte tuberkels, maar het voorkomen van zuurvaste staafjes in bepaalde gezwollen lymfeklieren.

Bij al deze experimenten moet men zeker zijn van de betrouwbaarheid van het filter, dat geen enkele bacil mag doorlaten. Daarmede hangt samen de vraag: kan één, of kunnen enkele bacteriën tuberculose verwekken en zoo ja, in den gewonen of in den atypischen vorm? Om deze vraag te beantwoorden hebben sommige onderzoekers het materiaal zoo verdund, dat naar schatting in een bepaald volumen één bacterie voorkomt. Als men echter bedenkt, welk een neiging t.b.c.-bacillen hebben om samen te kleven, zal men toegeven, dat deze methode onbetrouwbaar is. De micromanipulator biedt hier een mogelijkheid. Zonder op de resultaten, als niet ter zake dienende, verder in te gaan ¹⁾, wil ik de methodiek beschrijven.

Op het dekglasje (Fig. 28, maar met 4 in plaats van 6 druppels) werd materiaal van een zoo jong mogelijke t.b.c.-kultuur uitgestreken (zie pag. 232). Verder werden er 4 dikke druppels gelatine-bouillon (zie pag. 236) op afgezet. Met de fijne punt-naald (No. 4) werd één bacterie opgenomen — soms, naar verkiezing, meerdere — en langs de onderzijde van een gelatine-druppel afgestreken. Ondertusschen was door een helper in de huid van een cavia (aan de rugzijde, om secundaire infectie zoo veel mogelijk buiten te sluiten) een snede gemaakt en de subcutis een weinig los geprepareerd. Dan werd de druppel met de schoufelnaald (pag. 223) opgenomen en onder de huid afgestreken. De wond werd tenslotte met agraves gehecht en met verband bedekt. De gelatine smelt bij de lichaamstemperatuur en spoedig ligt de bacil vrij in het weefsel, waarin ze zich kan ontwikkelen.

¹⁾ Zie: J. van der Lee, Over filtreerbare vormen van het tuberculose-virus. Proefschrift. Utrecht 1928, pag. 75 e.v.

HOOFDSTUK IV.

De microcauter en het vervaardigen der naalden. ¹⁾

A. De microcauter.

Het vervaardigen der naalden, waaronder hier ook de micro-mesjes en micropipetten worden verstaan, geschiedt nagenoeg geheel onder het microscoop. Voor de oogvormige, waarbij het, willen ze bruikbaar zijn, zeer nauwkeurig op den vorm aankomt en voor de mesjes is dit zeker noodig; puntvormige naalden en micropipetten kan men op goed geluk ook wel uit de vrije hand trekken, maar wil men ze van bepaalden vorm en afmetingen maken, zooals dat voor verschillende doeleinden noodig is, dan moet dit eveneens onder het microscoop geschieden.

Bij de vervaardiging zijn kleine verplaatsingen in het gezichtsveld noodig. Daarvoor gebruikt men de beide naaldstatieven van den micromanipulator. Men schroeft deze los van het voetstuk en plaatst ze elk op een kleine, op drie punten rustende ijzeren plaat. De micromanipulator wordt daardoor eenigen tijd aan het gebruik onttrokken. Een bezwaar is dit echter niet, want, aan-gezien dezelfde naalden vele jaren kunnen gebruikt worden, be-hoeft dit niet dikwijls te gebeuren. Verder is 't geen vereischte, dat ieder onderzoeker zijn naalden zelf kan maken, wat allicht noodig zou zijn, als voor iedere nieuwe isolatie een nieuwe naald noodig was.

¹⁾ Zie ook: S. L. Schouten, Methode zur Anfertigung der gläsernen Isoliernadeln, gehörend zu dem Isolierapparat für Mikroorganismen. Zeitschr. f. wiss. Mikr. und für mikr. Technik. 1907, p. 258. Hierin is de grondgedachte van mijn microcauter reeds toegepast, nl. het uittrekken der glasnaalden langs mechanischen weg, dus niet uit de vrije hand, en de verdere bewerking, met verwarmd platinadraad, onder het microscoop.

Behalve de bovengenoemde voetstukjes voor de naaldstatieven heeft men noodig:

- 1e. een houder, waarin de naald wordt gelegd, tevens voorzien van een trekmechaniek (zie Fig. 74), te bevestigen in het rechter statief;
- 2e. een houder, die de platinagloeidraad draagt (Fig. 75), te bevestigen in het linker statief;
- 3e. vier verschillende gloeidraden. Fig. 76 geeft no. 1, van boven gezien, op $\frac{1}{2}$ van de ware grootte en van no. 2 alleen het uiteinde. Fig. 77 geeft ze alle, bij zeer zwakke vergrooting ($35\times$), onder het microscoop. Hiervan is no. 1 een horizontaal staand lusje van 0,2 mm dik platinadraad, waarop een groote glasparel is aangebracht. Dient voor de vervaardiging van puntnaalden en glazen mesjes. No. 2 is een gedraaid vertikaal staand lusje van 0,2 mm dik draad; bij goede instelling op het midden van de bocht ziet men deze als een smallen, scherp begrensden band. Voor de vervaardiging van middelsoort en groot oog en voor het ombuigen van naalden. No. 3 is een vertikaal staand lusje van 0,1 mm dik draad, waarop in het midden van de bocht een glaspareltje is bevestigd; vertoont zich volgens teekening, als op het midden wordt ingesteld. Dient voor het afbreken op een bepaalde dikte. No. 4 is als no. 3, maar zonder glasparel; voor de vervaardiging van het fijne isoleeroog.

Men lette op het volgende:

De gloeidraden worden vóór het gebruik altijd met een watje, gedrenkt in alcohol, van opgevallen stofdeeltjes gereinigd. Wil men om eenige reden een parel verwijderen en door een nieuwe vervangen, dan geschiedt dit het beste, als men het dunne deel van een fijne stalen naald in de lus steekt en deze wat aantrekt; daardoor wordt de bocht kleiner en barst het glas. Indien bij no. 2 en 4, die voor het ombuigen van glasdraden dienen, door een verkeerde handbeweging of door te sterke stroom ooit glas vastsmelt aan den platinadraad, moet men dezen door een nieuwen vervangen. Het ombuigen toch geschiedt ook door duwen van den platinadraad tegen den glasdraad (zie b.v. Fig.

133); in dat geval zou door het opzettend glaslaagje als intermediair allicht een ongewenscht versmelten van beide plaats hebben. Men late den stroom niet, wanneer de aandacht door het microscopische beeld wordt in beslag genomen, te lang gesloten;

- 4e. een microbrander, die een gasvlam geeft van $1-1\frac{1}{2}$ mm diam. Deze bestaat uit een koperen buis, op welks einde de recht-afgevilde canule van een injectiespuit (lumen 0,3 mm) is geplaatst. Men bevestigt die aan een gewone gasslang en kan hem naar verkiezing in de hand houden of klemmen in een laag statiefje, waarin tevens een dof zwart schermpje als achtergrond is aangebracht (Fig. 78); met een klemkraan op de gasslang wordt het vlammetje geregeld;
- 5e. accumulatoren met een spanning van 4 en 6 volt;
- 6e. een schuif rheostaat, voorzien van twee draden (waarlangs het glijcontact schuiven kan, n.l. a), een nicoline-draad van 0,35 mm diam., die als weerstand wordt ingeschakeld wanneer de platina-gloeidraden no. 1 en no. 2 (spanning 6 V) worden verwarmd, en b) een platina-draad van 0,1 mm diam., die gebruikt wordt met de platina-gloeidraden no. 3 en no. 4 (spanning 4 V);
- 7e. een stroomverbreker;
- 8e. richtplaatjes. Dit zijn bliken plaatjes, $2\frac{1}{2}$ cm hoog en 1 cm breed, gevormd door dubbelvouwen van een 5 cm lang strookje en van onderen vorksgewijs uiteengebogen (Fig. 79). Men legt de naald in den stand, die ze naderhand in den micromanipulator moet hebben, verwarmt ze op een afstand van 12 cm van de punt en brengt er dan wat zegel-lak op. Dan wordt het richtplaatje verwarmd en loodrecht op de naald bevestigd (Fig. 80);
- 9e. een verplaatsbaar staalplaatje, aldus geconstrueerd (Fig. 81, van boven gezien): a is een houten latje van ongeveer 2 cm lengte, dat past in de gleuf van de bewegelijke objecttafel, zooals de klemmen, die men bij gewoon gebruik daarvan inschuift. Aan a is een tweede latje b bevestigd, dat aan het einde een ongeveer 7 mm lang en 1 mm breed stukje van een Gillette-mesje c draagt; de scherpe kant (1 mm) staat verticaal. Daar de breedte van de gleuf

bij de bewegelijke objecttafels nogal kan verschillen, wordt de vervaardiging van dit eenvoudige apparaatje aan den gebruiker van den microcauter overgelaten;

- 10e. twee verplaatsbare glasstaafjes (Fig. 82 en 83). De vervaardiging hiervan zal geen bezwaren opleveren, als men weet, hoe een puntnaald (pag. 284) wordt gemaakt. Men bevestigt ze aan een soortgelijk latje als a van Fig 81. Het eene eindigt in een korte punt van $\pm 5\mu$ dikte; het andere is over 't algemeen $2 \times$ dikker en eindigt in een punt van $\pm 10\mu$;
- 11e. eenige kleine apparaten, die, met de hierboven genoemde, hieronder nader zullen worden omschreven als ze vanzelf ter sprake komen.

Als ondergrond voor de geheele opstelling dient een stuk spiegelglas van $\pm 50 \times 75$ cm en $\pm \frac{3}{4}$ cm dik, trilvrij in de 4 hoeken rustend op gummi, b.v. de bekende gummi-badsponzen. Daar het rechter- en linkerstatief op een kleine grondplaat staan, zal het microscoop ook iets hoger moeten staan, b.v. op een stuk spiegelglas, dat met 4 in de hoeken bevestigde kurken op het groote glas rust.

Ik zal nu overgaan tot de beschrijving van de vervaardiging der naalden. De verzoeking was groot, om dit in een oppervlakkigen vorm te doen, die den indruk zou wekken, als zou het hier een eenvoudige, vlotte techniek betreffen. Ik heb dat niet gedaan en met opzet den uitvoerigen vorm gekozen. Wie het poogt na te doen — wat toch de bedoeling is — zal waarschijnlijk inzien, dat er niet te veel van is meegedeeld.

B. Vervaardiging van den grondvorm der naalden.

De naalden worden gemaakt uit staven van gemakkelijk smelbaar glas; zeer geschikt is gewoon Thüringer. Men zoekt staven uit met ronde doorsnede, daar de staaf bij de bewerking gedraaid wordt, wat bij een min of meer elliptische doorsnede niet mogelijk is. De diam. bedraagt $3\frac{1}{2}$ mm. Oud glas is niet bruikbaar. Men neemt dus eenige nieuwe staven, snijdt ze terstond in stukken van 15 cm en bewaart die in alcohol.

De naalden ondergaan de volgende bewerkingen:

1. uittrekken in de groote vlam van een Bunsen'schen brander en daarna in de microvlam van den microcauter;

- II. afbreken op de gewenschte dikte, ter plaatse waar het oog, de punt, de pipet of het mes moet komen;
- III. vervaardigen van de punt, het oog, enz.;
- IV. schuin naar boven buigen van de laatste 5 mm der naald in de microvlam;
- V. horizontaal of bijna horizontaal stellen van oog of punt met den microcauter.

't Beste is, dat men er meerdere tegelijk maakt. Afgezien van het feit, dat men dan maar eenmaal den micromanipulator uit elkaar behoeft te nemen en het aangenaam is, met 't oog op breken, er eenige in voorraad te hebben, is er nog een ander motief. Voor het vervaardigen der naalden zijn allerlei kunstgrepen noodig, die men tot op zekere hoogte iederen keer weer opnieuw inoefent. Beschikt men dus, na enkele naalden gemaakt te hebben, weer over voldoende handigheid, dan is het jammer het werk te onderbreken. En daar elk der 5 hierboven genoemde bewerkingen haar eigen bijzonderheid heeft, doet men verstandig als men b.v. een dozijn naalden eerst alle de eerste der bovengenoemde bewerkingen doet ondergaan, daarna alle de tweede, enz. Behalve dat men door de herhaling van iedere bewerking daarin telkens meerdere vaardigheid verkrijgt, voorkomt dit ook de tijdroovende herhaalde veranderingen in de opstelling van den microcauter (wisseling van platina-gloeidraden, enz.).

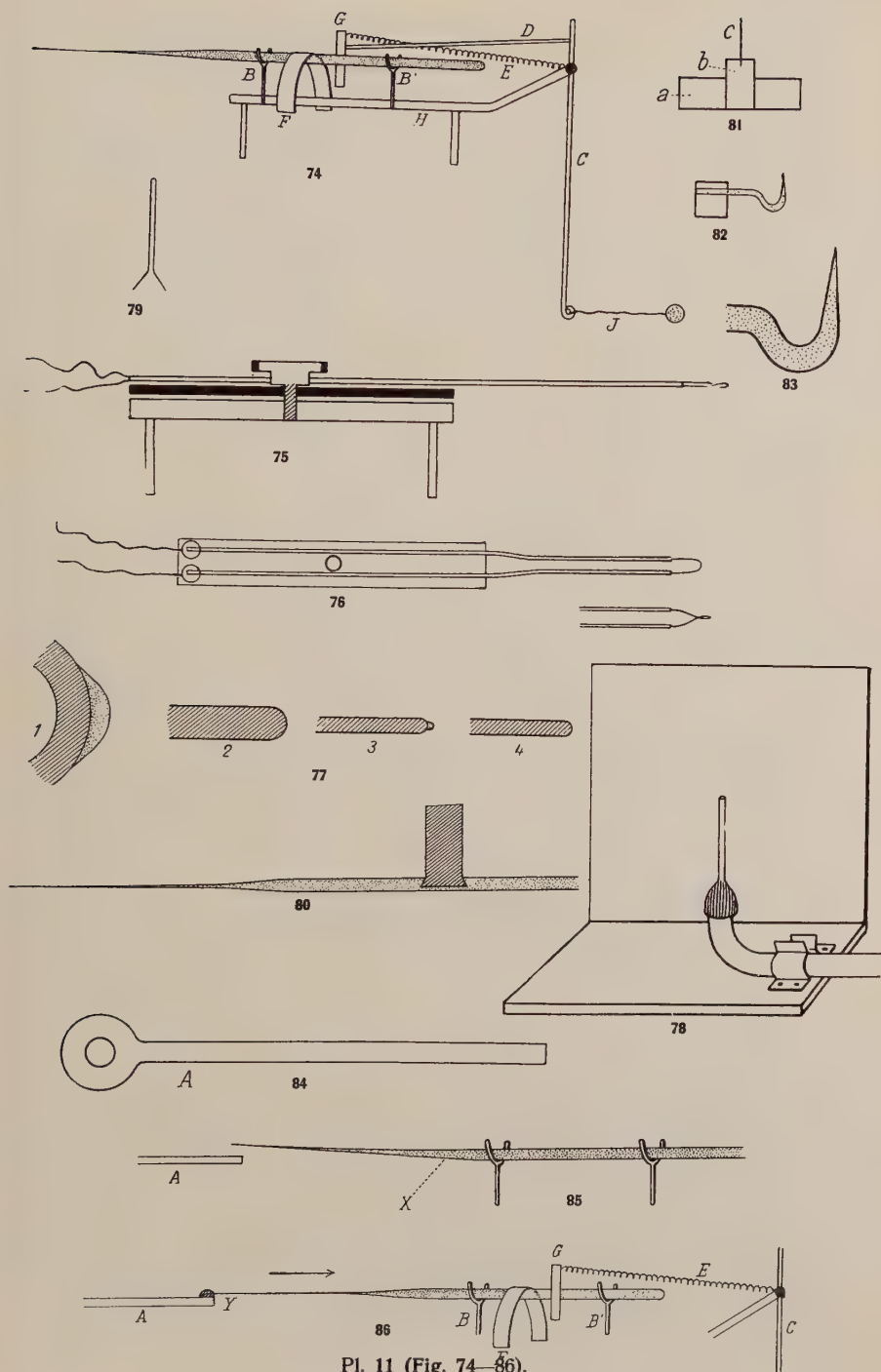
Het uittrekken in de groote vlam en daarna in de microvlam geschiedt als volgt. Van een staaf van 15 cm trekt men het einde door middel van een aangesmolten staafje in de vlam uit; wanneer men niet al te lang verhit en langzaam uittrekt, kan men de beweging zoo regelen, dat het uitgetrokken gedeelte $\pm \frac{3}{4}$ mm dik wordt. Voor pincetnaalden (zie pag. 287) is een dikte van 1 mm beter. Als de vlam te heet is, ontstaan er wel eens luchtblazen en, bij het uittrekken, kanalen, die tot de fijne punt doorloopen; bij het steriliseeren kan in die kanalen H_2SO_4 en NH_3 komen en het geïsoleerde microörganisme beschadigd worden. Men neemt dus in den Bunsen'schen brander niet de maximum luchttoevoer. Het dunne deel snijdt men af op 8 cm. Door mogelijke mislukkingen bij het vervaardigen der naalden wordt dit gedeelte steeds korter. Dit is doorgaans geen bezwaar,

daar een lengte van 5 cm bij een objecttafel van 9 cm breedte nog voldoende is.

Nu onderzoekt men eerst of het dunne en het dikke deel in een rechte lijn loopen; meestal is dat niet volkomen het geval. Men legt daartoe de naald, zonder meer, in den houder van het rechter statief en plaatst in den houder van het linkerstatief, in plaats van den platina-gloeidraad, de staaf A (Fig. 84, van boven gezien). Deze is van koper, vierkant op doorsnede en 3 mm breed. De opstelling wordt dus (eenigszins overdreven) volgens Fig. 85. Men kan het al of niet recht zijn van de naald beoordeelen door de punt dicht bij het uiteinde van A te brengen en ze dan om haar as te draaien. Daarna stelt men de statieven zoo, dat de naald, wanneer ze in het punt X met de spaarvlam van een Bunsenbrander langzaam (om onnoodig doorzakken in X te voorkomen) wordt verwarmd, met de punt op A valt en dan vrijwel recht is.

Nu wordt het uiteinde van de naald nog fijner uitgetrokken. Het stuk A in 't linkerstatief wordt omgekeerd (Fig. 86); op het uiteinde laat men een druppel zegellak vallen. Om de glazen naald schuift men een caoutchouc schijfje G van 18 mm diam. en 8 mm dikte (te snijden uit een gewone caoutchouc kurk), in welks midden een gat is aangebracht en op den omtrek, op afstanden van 90° , 4 inktstreepjes. Tusschen dit schijfje en den hefboom C brengt men de 11 cm lange stalen staaf D (Fig. 74), waardoor G en B' op zekeren afstand van elkaar verwijderd worden. Om G legt men een beugeltje, waaraan 2 spiraalveeren E zijn bevestigd ¹⁾, die met de uiteinden worden vastgemaakt aan de as van de vork, waarin C draait. (Het schuin-oplopend deel van H moet men zich dus als een vork denken; het horizontale gedeelte is een platte, 2 cm breede staaf.) F, een U-vormig plat ijzeren stuk (ruiter), wegende 50 g (voor middensoort en groote isoleeroogen verzwaard met 80 g; voor het uittrekken van punten wordt er een van 10 g gebruikt) wordt over de glazen staaf gelegd. Men zorgt voor goede verlichting en een zwarten achtergrond, dicht achter het punt Y, waarvoor het schermpje van den microbrander (zie pag. 277) kan dienen. Nu zorgt men, dat het uiteinde van de glasstaaf even hoog komt als de boven-

¹⁾ Duidelijkheidshalve is het beugeltje niet aangegeven, en van de 2 evenwijdig loopende veeren slechts eene.



Pl. 11 (Fig. 74—86).

kant van de lak op A en daarna smelt men het in de lak vast. Dan neemt men D weg (Fig. 86), zoodat de veeren op de glasstaaf in de richting van het pijltje trekkracht uitoefenen. De microvlam wordt nu onder het punt Y gehouden; het glas smelt en de glasstaaf springt met een fijn uitgetrokken punt terug, totdat G tegen de vork B' stuit. 't Is duidelijk, dat de kracht en de snelheid van dit terugspringen zal afhangen van de volgende factoren: de hitte van de vlam, de kracht der veeren, het gewicht van F, de afstand tusschen G en B' en de meerdere of mindere smeltbaarheid van het glas. De laatste factor kan verschillen. Bij de glassoort en de veeren, die ik jarenlang gebruikt heb, was een afstand van 17 mm tusschen G en B' voldoende. Heeft men met glas te doen, dat bijzonder gemakkelijk smeltbaar is, dan kan de glasstaaf terugspringen zonder daarbij een fijn uitgetrokken punt te vormen. De beweging moet dan dus versneld worden. Dit kan gebeuren door het aanwenden van een grootere trekkracht, die men krijgt door een grootere staaf D, b.v. van 13 cm, te gebruiken en dus den afstand van G tot B' te vergrooten; ook kan men een lichter gewicht F van 10 g nemen. Men handelt dus naar bevinding. De beugels B en B' worden, zoo noodig, met wat olie gesmeerd.

Men zal de opmerking maken, dat dit uittrekken van de glasstaaf ook wel uit de vrije hand kan geschieden, zooals de andere micromanipulatorwerkers dit trouwens ook doen. Bovenstaande methode verdient echter m.i. de voorkeur om twee redenen:

- 1e. wordt hier in rechte richting getrokken, zoodat het uitgetrokken fijne uiteinde niet gekromd is, wat voor de verdere bewerking van de naald van belang is. Een grooter voordeel is het, dat men
- 2e. het vrijwel in de hand heeft een uitgetrokken einde te maken, dat verwerkt kan worden tot het fijne bact.oog of de fijne puntnaald, dan wel een waaruit het grootere isoleeroog, de grove punt of het glazen mesje kan vervaardigd worden. Voor het eerste neemt men de gasvlam zoo klein mogelijk en maakt men eerst een zeer dun plekje in den draad; daarna brengt men het vlammetje dicht bij dat plekje. Zoodoende zal er weinig glasmassa smelten en het uiteinde dus plotseling zeer dun uitloopen; als het goed is,

moet het in de lucht heen en weer waaien. Voor het tweede neemt men de microvlam iets grooter en houdt men die op grooteren afstand onder den draad; er zal dan meer glas-massa smelten en het uiteinde is dikker. Men beoordeelt het resultaat telkens met het microscoop (zwakke vergrooting).

Bij de beschrijving der naalden zal van de oognaalden de draaddikte worden genoemd: het fijne oog $\pm 8\mu$, het middensoort oog $\pm 25\mu$, het groote oog $\pm 75\mu$. 't Is echter niet voldoende als de draad op één plaats die afmeting heeft; 't geheele oog moet (althans ongeveer, want een uitgetrokken draad zal altijd iets dunner uitloopen) dezelfde draaddikte hebben. Voor 't fijne oog is daarom noodig een stuk van $\pm 75\mu$ lang en $\pm 8\mu$ dik; voor het middensoort oog is noodig $\pm 300\mu$ lengte en $\pm 25\mu$ dikte; voor het groote oog $\pm 1\text{ mm}$ lengte en $\pm 75\mu$ dikte. Door de ervaring leert men wel hoe ver men hier van de ideale maat mag afwijken. Een tweede eisch, die ook voor puntnaalden geldt, is deze: het dunne gedeelte van de naald mag niet te lang zijn; daardoor zou ze te slap worden. In Fig. 87 geven wij een bruikbare dikteverhouding voor een fijne oog-naald; als AB 700μ lang is, is de naald bij B 50μ en bij C 150μ dik; ik wil daarbij echter uitdrukkelijk verklaren, dat hiervan nogal wat kan worden afgeweken.

Onder de naalden, die met de microvlam zijn uitgetrokken, zal men er altijd verscheidene vinden, die al terstond aan deze voor oognaalden gestelde eischen voldoen. Maar er zullen er ook zijn, die niet voldoen en wel omdat ze te sterk in doorsnede afnemen. Zulke naalden kunnen dan verwerkt worden tot puntnaalden of tot een snijnaald, omdat een conisch verloop bij deze niet hindert. Men kan ze echter ook afbreken op $\pm 40\mu$ dikte en dan onder het microscoop met den gloeidraad no. 1, die ook voor het glazen mesje gebruikt wordt, uittrekken tot een stuk, waaruit een fijn oog kan worden vervaardigd (niet een grof oog, want de hiervoor vereischte naald kan alleen met den microbrander worden verkregen). Misschien zullen sommigen deze methode van microbrander + gloeidraad voor het fijne oog verkiezen boven die van den microbrander alleen. Het vervaardigen van een fijn oog kan wel eens mislukken. De glasnaald in kwestie is daarna dan nog altijd geschikt voor de vervaardiging van een punt-naald.

Voor het afbreken wordt gebruikt gloeidraad no. 3. Het glas-

pareltje brengt men daarop aldus aan. Een uitgetrokken glasstaaf, waarvan men het fijnste uiteinde op een punt ter dikte van $\pm 30 \mu$ heeft afgebroken, wordt gelegd in het rechter statief, zoodat ze met het trekmechaniek kan worden bewogen; de gloeidraad in het linker. Bij zwakke vergrooting brengt men beide tegenover elkaar en wel de glaspunt tegenover het midden van de verticaal staande platina-lus (Fig. 88, zooals men de lus van terzijde zou zien). Terwijl men het platina even laat gloeien, brengt men door een heen- en weergaande beweging de glaspunt er tegen aan; men herhaalt dit zoo noodig totdat men een parel van de gewenschte afmeting heeft.

De glasdraad, die op een bepaalde dikte moet worden afgebroken, legt men in het rechter statief, bezwaard met den ruiter van 50 g. Men zorgt — dit geldt voor alle fijnere bewerkingen! — dat het uiteinde schoon is (zwavelzuur, daarna ammonia). Het statief wordt recht vóór het microscoop geplaatst. Bij zwakke of iets sterkere vergrooting (Leitz obj. 4 is hier b.v. zeer goed te gebruiken) brengt men de glasparel tegenover de plaats, waar de naald moet worden afgebroken. De dikte van 8μ , voor het kleine oog, wordt desverkiezend met sterkere vergrooting bepaald; in de andere gevallen kan men dit met zwakke vergrooting doen. Daarna doet men de glasparel samensmelten met den glasdraad. Wanneer men den glasdraad dan beweegt in de richting van de pijl (Fig. 89), breekt ze onder de glasparel af, doorgaans met een rechte breukvlakte. Wanneer men bij het afsmelten op 8μ het platina te sterk verhit, kan de draad door de hitte terugbuigen vóór de platinanaald er mede heeft kunnen samensmelten (Fig. 90). Dit terugbuigen kan men verhinderen door zwakke verhitting, maar dan, teneinde goede samensmelting te krijgen, herhaalde malen en door tevens gebruik te maken van het verplaatsbare glasstaafje (zie pag. 278), dat men tegen den draad zet (Fig. 91).

Vóór ik het vervaardigen van de verschillende naaldtypen ga beschrijven, moge nog een opmerking van algemeenen aard voorafgaan.

Geen naald kan voor het gebruik gereed geacht worden, vóór ze is geprobeerd. Afwijkingen, zóó klein, dat het aan den vorm niet gezien kan worden, kunnen maken, dat ze minder geschikt zijn. Dit luistert vooral nauw bij de fijne oog- en de fijne puntvormige. Een oog kan b.v. te veel of te weinig zijn dicht gebogen;

blijkt de fout bij de contrôle, dan kan die meestal nog worden hersteld.

C. P u n t n a a l d e n.

Het gemakkelijkst is de grove schuine puntnaald te maken. Men plaatst in het linkerstatief gloeidraad no. 1. In het rechterstatief een glasstaaf, die bij $\pm 15 \mu$ is afgebroken, bevestigd in het trekmechaniek. Daar de beweging hier zeer snel moet geschieden, legt men op de staaf een ruit F van 10 g en spant men de veeren met de lange staaf D. In dit geval verzuime men niet, de vorkjes B en B' met wat olie te smeren. Niet al te zwakke vergrooting; obj. 4 van Leitz is zeer goed. Schuif de statieven zoo, dat de glasparel rechts van het midden in het gezichtsveld en de punt van de naald links bij den omtrek komt (Fig. 92). Doe den platinadraad even niet al te sterk gloeien en bepaal het punt, waar, bij de warmte-uitzetting, de buitenkant van de glasparel komt. Trek dan den hefboom C door middel van het draadje J, waaraan een kurkballetje is bevestigd (Fig. 74) snel zoo ver om, dat het uiteinde van de naald op dat punt komt. Tegelijkertijd wordt even gegloeid, waarna men terstond na de aanraking van glaspunt en glasparel den hefboom terug laat springen. Men krijgt dan een uitgetrokken puntje, dat verschillend uitvalt, nu eens meer volgens Fig. 93 (grove punt), dan weer meer volgens Fig. 94 (fijne punt). De punt van de grove naald mag niet fijner zijn dan 1μ . Toch zal het resultaat meermalen niet naar wensch zijn; men stoot dan de punt stuk tegen de glasparel, smelt — zoo noodig — het uiteinde rond door gloeien op korten afstand en hernieuwt de poging.

Is de punt aan den glasdraad gemaakt, dan wordt het uiteinde over een afstand van $\pm 5 \text{ mm}$ omgebogen, zoodat het stuk AB een hoek van $\pm 20^\circ$ met de oorspronkelijke richting BC maakt (Fig. 95). Dit geschiedt boven de microvlam, die men in den houder, voorzien van het zwarte schermpje, op dezelfde hoogte plaatst als het oog; bij schel van boven komend licht doet een klep boven de oogen goeden dienst.

Deze stand van de punt is echter nog niet de ideale voor het inbrengen van de geïsoleerde bacil in den cultuurdruppel. Deze bacil bevindt zich in een klein druppeltje naast den cultuurdruppel (Fig. 24). Doordat de hoek tusschen naald en dekglas klein

is, wordt een groot gedeelte van dat druppeltje bij aanraking met de naald tusschen naald en dekglas gezogen (Fig. 96), waardoor de bacil aan het gezicht kan worden onttrokken. Maar een ernstiger bezwaar is nog, dat ook de cultuurdruuppel, zoodra men die aanraakt op het moment van het inbrengen van de bacil, tusschen naald en dekglas uitvloeit en door de strooming de bacil wegzuigt en aan het gezicht onttrekt. De naald moet dus een grooteren hoek maken met het dekglas. Een verder ombuigen van de laatste 5 mm is echter minder gewenscht in verband met de hoogte van de isoleerkamer. Daarom wordt alleen het laatste gedeelte, groot $\pm 200 \mu$, nog extra omgebogen, zoodat het met het dekglas een hoek van $\pm 45^\circ$ (Fig. 97) maakt. Voor dit ombuigen gebruikt men het boven (pag. 277) beschreven staalplaatje. Men legt de puntnaald in het statief, met het omgebogen einde nauwkeurig in het horizontale vlak; de juistheid van dezen stand wordt bij zwakke vergrooting vastgesteld. Dan wordt (contrôle met ongewapend oog) de naald zoo gesteld, dat de punt ongeveer tegenover het midden van den scherpen kant van het staalplaatje komt te staan. Tenslotte brengt men alles bij zwakke vergrooting in het gezichtsveld, zoodat men de opstelling ziet van Fig. 98: b is het staalplaatje, dat een weinig in de richting van de pijl wordt bewogen, zoodat het, zonder het teere uiteinde te raken, de naald a een weinig ombuigt; wanneer nu gloeidraad no. 4 (c) even verwarmd wordt, wordt a op een plaats, ongeveer 200μ van de punt verwijderd, omgebogen. Men heeft er slechts voor te zorgen, dat door te korten afstand tusschen a en c, te sterke verwarming of een verkeerden stand van a t.o.v. b, het uiteinde van den glasdraad niet te ver wordt omgebogen, zoodat de fijne punt gevaar loopt in aanraking te komen met den scherpen kant van het staalplaatje, of a aan c vastsmelt. 't Is duidelijk, dat het staalplaatje niet alleen dient om de glasnaald te buigen, maar ook om de fijne punt te beschermen tegen de hitte. Men plaatst, om de grootte van den hoek te bepalen, een meetoculair zoo, dat de strepen, terwijl men op eenigen afstand door het oculair ziet, in dezelfde richting loopen als het dikke deel van de naald, waarmede deze op de vorkjes van den naaldhouder rust. Door ruwe schatting kan men dan gemakkelijk zien, of het laatste omgebogen stukje $\pm 45^\circ$ afwijkt.

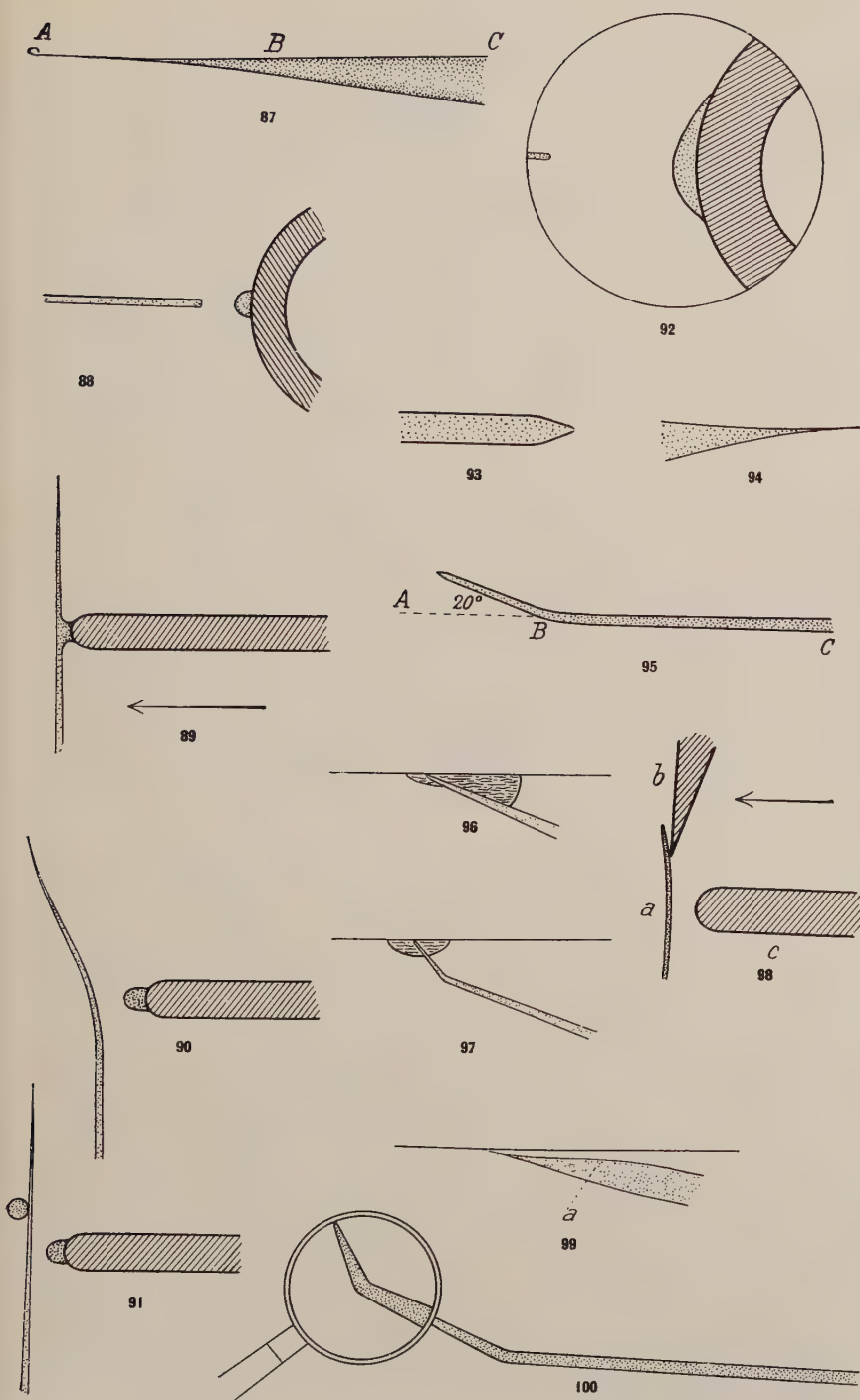
Een naald van Fig. 93 verzamelt, door haar stompen vorm,

rondom de punt voldoende vloeistof om de bacil mee te trekken; een punt, meer in den vorm van Fig. 94, zou dit niet kunnen.

Hoe men deze laatste, die voor het isoleeren van aan het dekglas klevende bacteriën gebruikt wordt, vervaardigt, zal thans worden beschreven. Ze moet, daar ze tusschen bacil en dekglas geschoven wordt, liefst niet dikker zijn dan $\pm \frac{1}{6} \mu$. Men beoordeelt dit voorloopig met een sterk droog systeem; het trillen van de daarbij vrijstaande naald wordt voorkomen door ze dicht bij de punt met het verplaatsbaar staalplaatje vast te zetten. Daarna, door ze midden in een grooten druppel te brengen en dan het dekglas te doen raken. Aan den rand van een druppel of tusschen de condensatiedruppeltjes schijnt ze door brekingsverschijnselen altijd dikker. Is de punt te dik, dan duwt ze de bacil voor zich uit, maar neemt ze die niet op. Is het dunne deel echter te lang, zoodat het, tegen het dekglas klevende, als een zweephaar wordt bewogen, dan glijdt de bacterie er af. Door eenige ervaring bemerkt men wel spoedig, welke de gewenschte vorm is. Deze punt is na het ombuigen boven de microvlam eveneens nog niet bruikbaar. Ze heeft dan den stand van Fig. 96; door de sterke helling zou de bacterie er af glijden. De punt moet dus, in tegenstelling met de vorige naald, meer horizontaal staan (Fig. 99), echter niet zoo, dat het dikke gedeelte a te dicht bij het dekglas komt, waardoor zich daar ter plaatse vocht zou verzamelen. 't Is voldoende als a $\pm 3 \mu$ lager staat dan de punt van de naald. Dit bereikt men, *mutatis mutandis*, op de wijze, die zoo juist is beschreven voor de grove puntnaald, terwijl men ook hier den stand controleert met het micrometer-oculair, maar dan bij sterke vergrooting.

Tenslotte moet er van het dikke achtereinde van de naald nog een stuk afgenomen worden; ze mag n.l. niet uitsteken buiten den naaldhouder M (Fig. 4). Men doet dit — ook bij de andere naalden — door uittrekken in een kleine vlam en niet door middel van een glasvijl, daar door den schok van het breken de punt kan afspringen. En men doet dit niet vóór dat de naald op haar bruikbaarheid is beproefd. Door dit inkorten wordt ze n.l. te kort voor het statief van den microcauter, ingeval men nog eventueele verbeteringen zou willen aanbrengen.

De fijne puntnaald moet met voorzichtigheid behandeld worden. Bij het stellen in het statief zorg men er daarom voor, dat de punt zoo laag mogelijk in de isoleerkamer zich bevindt,



Pl. 12 (Fig. 87—100).

opdat ze niet in te ruwe aanraking komt met het dekglas, terwijl men dit op de isoleerkamer legt.

Een andere puntnaald dient om te snijden. Het einde moet, zal het door den celwand kunnen dringen, krachtiger zijn dan dat van de vorige, maar toch in een zeer scherpe punt uitloopen. Na het ombuigen van de laatste 5 mm boven de microvlam volgt geen verder ombuigen van de uiterste punt. Ze vormt dus met het dekglas een hoek van 20° , zoodat ze bij het snijden iets tegen het glas kan ombuigen en daardoor de noodige kracht kan ontwikkelen. Deze naald wordt ook gebruikt bij het isoleeren van granula, enz., aan de punt voorzien van een gelatine-druppeltje (zie pag. 235).

Een vierde model puntnaald wordt gebruikt bij het los-prepareren van weefselcellen, in vereeniging met het micropincet. Vervaardiging: afbreken met gloeidraad no. 3 op $30\ \mu$. Uittrekken met gloeidraad no. 1 tot een korte en scherpe punt van $1\ \mu$. Ombuigen van de laatste 5 mm boven de microvlam en daarna van de uiterste $200\ \mu$, zoodat dit deel bijna loodrecht naar boven staat. Volkomen loodrecht is niet gewenscht, daar de punt dan boven het dikkere deel komt en daardoor niet scherp kan worden gezien; bovendien is een eenigszins schuine stand beter bij de trekkende beweging van het snijden (Fig. 103).

D. Micropincet en pincetnaalden.

Dit zijn naalden van zwaarder bouw, zoodat ze niet zoo gemakkelijk doorbuigen. Men vervaardigt ze aldus:

Uittrekken in groote vlam tot een stuk van 8 cm lengte en ± 1 mm dikte;

uittrekken boven microvlam, die men iets groter neemt dan bij de gewone puntnaalden (zie pag. 281);

afbreken met gloeidraad no. 3 op hoogstens $30\ \mu$;

uittrekken met gloeidraad no. 1 tot een conische en niet al te scherpe punt (b.v. van $2\ \mu$);

ombuigen van de laatste 5 mm boven microvlam (vgl. Fig. 95), tot een hoek van $\pm 30^\circ$;

ombuigen van de laatste $150\text{--}200\ \mu$, zoodat de naald den vorm krijgt van Fig. 100 (uiteinde vergroot), op de wijze, zooals die voor de puntnaalden is aangegeven (Fig. 98). 't Is niet gewenscht, dat de glasdraad op de plaats van de laatste om-

buiging dikker is dan $30\ \mu$, daar ze dan te moeilijk voldoende warm wordt om er de bocht in te maken.

Terwijl de naald met het omgebogen gedeelte in het horizontale vlak blijft, bevestigt men op een afstand van 11 cm van de punt een richtplaatje in loodrechten stand. Op dezelfde wijze wordt een tweede naald gemaakt. Ook deze wordt voorzien van een richtplaatje, waarbij men er echter rekening mede houdt, dat de omgebogen punten van beide naalden naar elkander moeten wijzen (Fig. 101; AB is de plaats van het richtplaatje; de omgebogen punt is vergroot weergegeven). Ten slotte worden de naalden ingekort tot $15\frac{1}{2}$ cm.

Het micro-pincet, waarin ze bevestigd worden, is afgebeeld in Fig. 102.

Op een koperen plaat A, 9×2 cm groot, rust een koperen plaat B, die aan het vooreinde dezelfde breedte heeft als A, maar overigens 0,8 cm breed is. (In de Fig. is duidelijkheidshalve B iets kleiner geteekend dan A). B wordt op A en tegen de stootstukjes D en E gedrukt door een veer C. Dit is de eenige bevestiging van B. Op A staan twee korte gootjes F; op B staan er ook twee. In deze gootjes komen, in plasticine gevat, de naalden te liggen. Naald H ligt dus vast; naald G kan op twee manieren bewogen worden. Door schroef J kan het vooreinde van B verschoven worden, terwijl het achtereinde tegen E blijft gedrukt. Daardoor kan de afstand tusschen de punten van de naalden grooter of kleiner worden. Door schroef K (in de fig. van boven gezien) kan het achtereinde van B hoger en lager gesteld worden. Daardoor kan men de punten van de naalden even hoog stellen, of naar verkiezing een weefsel eerst met de eene punt en daarna met de andere pakken.

Het stellen van de naalden in het pincet geschiedt aldus:

Het microscoop wordt in den micromanipulator precies in het midden tusschen de naaldstatieven geplaatst, terwijl de schroeven A 6 mm (12 windingen) zijn uitgeschroefd. Men drukt de naalden, met het richtplaatje verticaal naar boven en de omgebogen uiteinden naar elkander gekeerd, oppervlakkig in de plasticine en zet het pincet in het statief, zoodat de naalden op de voorwerptafel van het microscoop rusten. Nu draait men de richtplaatjes zoo naar buiten, dat zij met elkander een hoek van 90° maken. De omgebogen uiteinden, die eerst beide in een horizontaal vlak lagen, zullen dan beide schuin naar boven ge-

richt zijn en eveneens een hoek van 90° met elkaar maken. In dezen stand loopen de naalden, 1 cm van elkaar gescheiden, evenwijdig aan elkaar. Willen de punten elkaar kunnen raken, dan moeten ze convergeeren. Men verbuigt ze dus, door onder L (Fig. 102), waar de naald reeds dunner wordt, de microvlam van den microcauter te houden en tegen het uiteinde te duwen met b.v. een prepareernaald, zoodat ze, over de objecttafel glijdend, tenslotte voldoende convergeeren. Dit verwarmen moet voorzichtig gebeuren. Het glas mag alleen week worden; de naalden mogen op de verwarmde plaats niet doorzakken of tordeeren. Ten slotte worden ze bij zwakke vergrooting nog nauwkeurig gesteld. Het resultaat moet zijn, dat ze:

- 1e. diep genoeg in de plasticine komen te liggen;
- 2e. elkaar met de punten kunnen raken als J een eindje is ingeschroefd, terwijl ze na terugschroeven van J ongeveer $\frac{3}{4}$ mm van elkaar staan;
- 3e. met de punten even hoog staan als K is teruggedraaid en B dus geheel op A rust;
- 4e. met de punten iets voorbij het midden van het gezichtsveld komen, terwijl schroef A — van beide naaldstatieven — 6 mm is uitgeschroefd en het microscoop zuiver in het midden staat. Voor de bedoeling hiervan zie pag. 241.

E. Micropipetten.

Deze worden op vrijwel dezelfde wijze vervaardigd als de puntnaalden. Men gaat uit van buizen, uitwendig $3\frac{1}{2}$ mm in diam., met een wanddikte van ruim $\frac{1}{2}$ mm. Ze worden eerst uitgetrokken in de groote vlam en daarna boven de microvlam. Men gebruikt daarbij de lichte ruit F van 10 g en de lange staaf D (Fig. 74); door de groote trekkracht van de spiraalveeren loopt dan het dunne einde zeer 'snel conisch toe. Dit is een factor van het grootste gewicht; is het capillaire gedeelte iets te lang, dan is het vrijwel onmogelijk het vloeistofkolommetje daarin te verplaatsen, hoe sterk de uitgeoefende druk ook is. Met gloeidraad no. 3 kan het einde op iedere gewenschte doorsnede *met een volkomen gladden rand* worden afgebroken; afbreken op andere wijze geeft een rand met hinderlijke punten, e.a. ongelijkheden. Daarna wordt het laatste eind over 5 mm schuin omgebogen en tenslotte de punt over $\pm 200 \mu$ met gloeidraad no. 2 bijna loodrecht naar boven gebogen.

Is de pipet te lang, dan mag het overtollige stuk niet door invijlen en afbreken verwijderd worden, maar door invijlen en aanraken met een gloeiend glasstaafje. Men bevestigt ze in den naaldhouder M zoo, dat achter de plasticine, maar toch nog binnen den naaldhouder, zich een vrij uiteinde van ± 1 cm bevindt, waarom een caoutchouc buisje kan worden geschoven, ter verbinding met blaasbuis of verwarmbare micropipet-installatie.

Men bewaart de micropipetten, gelijk bekend is uit 't werk van Chambers e.a., met de punt ondergedompeld in aq. dest., gewat in een doorboorde kurk, in een dikwandig reageerbuisje, het achtereinde afgesloten met een watpropje om het invallen van kurkdeeltjes en van stof te voorkomen.

F. Micromessen van glas.

Hiervoor wordt gebruikt gloeidraad no. 1. De glasparel wordt hierop aldus aangebracht. Het statief met een uitgetrokken glasstaaf wordt recht voor het microscoop gezet, zóó, dat het deel van de staaf, dat 20 à 30 μ dik is, tegen het buitenste deel van de bocht van den platinadraad komt te liggen. Men zorgt er voor, dat de omtrek van glas en van platina elkaar als raaklijn en cirkelboog raken. Men sluit herhaaldelijk zeer kort den stroom, juist voldoende om het glas aan het platina te doen vastsmelten. Daarbij legt zich het glas om de bocht heen. Bij afkoeling zal de staaf bij a (Fig. 104) springen. Daarna sluit men den stroom herhaaldelijk en telkens zeer kort, totdat het glas min of meer plat tegen het platina aanligt (Fig. 105, op doorsnede). Hierbij mag het glas niet te sterk gloeien, daar er dan in de glasmassa luchtbellen ontstaan, waardoor het tot een schuimige structuur kan komen. Is de glasparel ter plaatse van ab ongeveer 35 μ dik, wat men doorgaans niet in eens bereikt, maar waartoe men op de eerst-ontstane parel een tweede stuk glasdraad moet leggen, dan zet men het statief met de naald, waaraan men een mes wil maken en die een uiteinde heeft van 30—40 μ , rechts van het microscoop. Het trekmechaniek (Fig. 74; lichte ruiter F van 10 g en lange staaf D) wordt aangebracht. Bij zwakke vergrooting ziet men rechts in het gezichtsveld den gloeidraad, links nog juist het einde van de glasnaald, dat men door trekken aan J tegen het midden van de glasparel zet (zuiver instellen!). Door stroomsluiting doet men beide goed met elkaar versmelten. Dan wordt de stroom verbroken en ter-

stond daarna, zoodra het glas hard is, het kurkballetje van J losgelaten. Door inkrimpen van het platina en de trekkracht der veeren, springt de glasparel langs de stippellijn pq (Fig. 106). Het resultaat is in de meeste gevallen een bruikbaar micromesje; de vorm kan intusschen verschillen. Men kan hebben een mesje met een langen, dunnen, vlijmscherpen kant, maar ook een dat dikker en daardoor iets minder scherp is (Fig. 107a en b). Als 't goed is moet de scherpe kant absoluut zuiver zijn. De vorm van Fig. 107a is noodig bij zeer fijn werk en gemakkelijk snijdbaar materiaal; Fig. 107b kan gebruikt worden voor iets grover werk en taaiere weefsels. Men bedenke echter, dat de scherpe kant, als ze al te dun is, spoedig afbrokkelt. Doorgaans zullen niet alle kanten bruikbaar zijn, maar een gedeelte (b.v. het korte stuk x in de fig.) onbruikbaar. De voorloopige beoordeeling van het mes heeft plaats terstond na het stukspringen van de parel; door varieeren der belichting vindt men de voorwaarden, die het gunstigst zijn om den scherpsten kant, al draaiende, van alle kanten te bezien. Voor het verkrijgen van een juist beeld is echter een tweede contrôle noodig met het horizontaal staand microscoop (Fig. 108).

Men plaatst de geheele installatie op gelijke hoogte als het oog. De voet van het microscoop wordt, zoo noodig, verzwaard; abbe, iris en spiegel worden verwijderd. De naaldhouder van het rechterstatief wordt met één staafje vastgezet en steekt daardoor zoo ver voor het statief uit, dat het mesje in het vlak van de objectafel (x in de fig.) kan komen. De naald is belast met den ruiters F van 50 g en draagt nog het caoutchouc schijfje G. Men stelt eerst in bij zwakke vergrooing, daarna bij iets sterkere (b.v. Leitz obj. 4; xx in de fig.). Door middel van het schijfje G kan men het mesje zoo draaien, dat de scherpe kant met de plaats, die zich het best voor snijden leent, in het gezichtsveld aan den onderkant komt (fig. 109, waarin het donkere plekje de plaats van aanhechting is). In dezen stand wordt de naald voorzien van een loodrecht naar boven staand richtplaatje. Daarna wordt het einde, over 5 mm, 20—30° omgebogen boven de microvlam, terwijl men het richtplaatje loodrecht naar beneden houdt. Daardoor zal de stand van het mesje iets achterwaarts gericht zijn, wat intusschen niet hindert. Wil men niettemin een zuiver loodrecht staand mesje hebben, dan kan men dit gedaan krijgen met het verplaatsbaar staalplaatje en gloeidraad

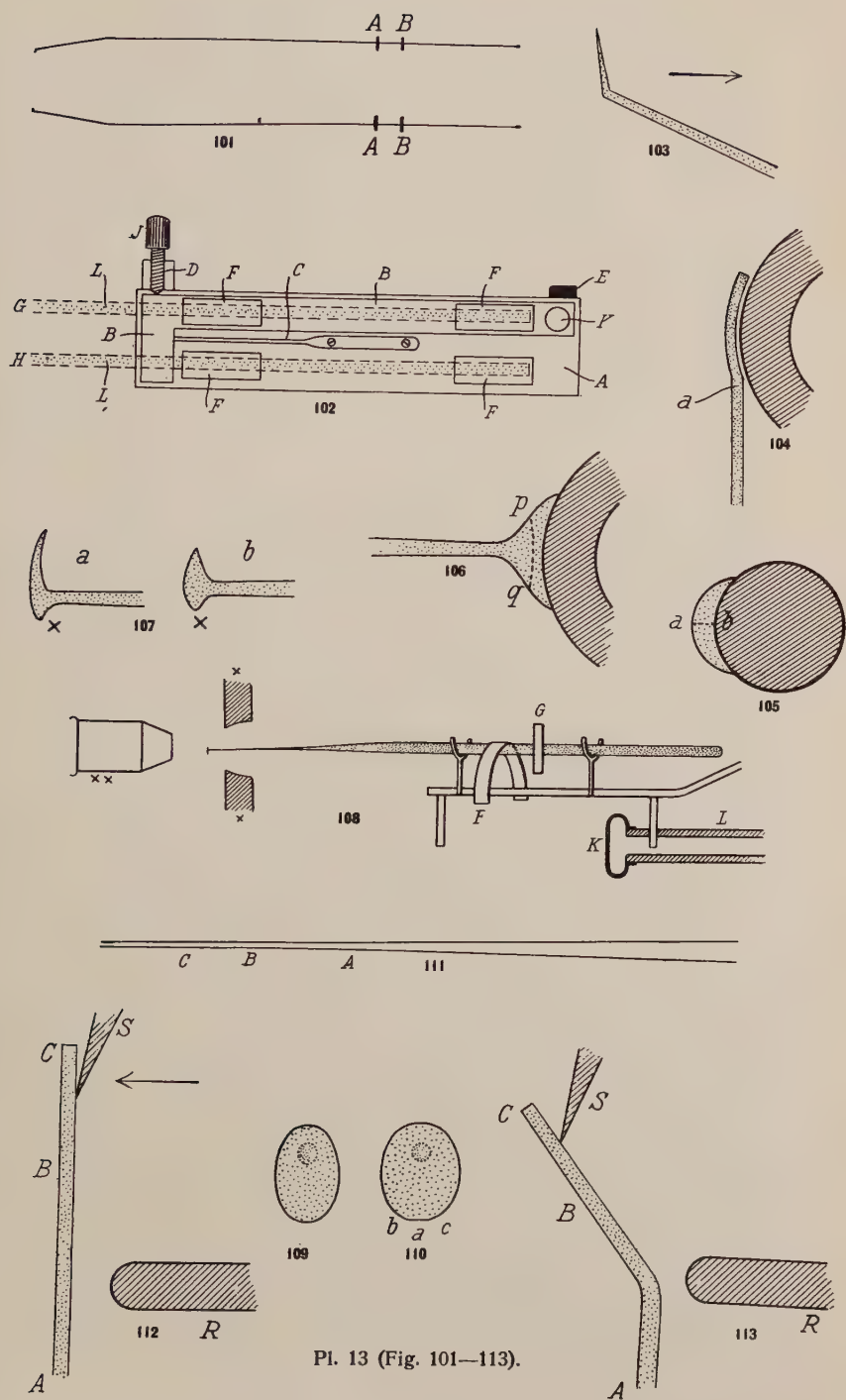
no. 2, mits men zorgt, dat de scherpe kant van het glasmesje daarbij geheel vrij blijft (vgl. pag. 285; de opstelling is hier eenigszins anders en gemakkelijk te vinden).

Het mesje wordt voorzichtig gebruikt; raakt het 't dekglas, dan is verder aandrukken ongewenscht. Toch zal, ook bij voorzichtig gebruik, de scherpe kant na eenigen tijd stomp worden. Met het horizontaal staand microscoop en in dit geval met schuin opvallende verlichting onderzocht, zal men b.v. het beeld van Fig. 110 te zien kunnen krijgen. 't Behoeft dan niet altijd vervangen te worden door een nieuw. Want dikwijls vindt men aan weerskanten van het afgesleten gedeelte a nog goede scherpe gedeelten b en c. Men bevestigt een richtplaatje aan de naald en draait ze daarmede, zoodat b aan den bovenkant komt. Later kan men dan hetzelfde nog doen voor c.

G. Groote isoleeroogen.

Daar de draad, waaruit deze vervaardigd worden, vrij dik moet zijn, verlangzaamt men bij het uittrekken boven de microvlam de beweging. De ruit F van 50 g wordt dus bovendien verzaard met een van 80 gram; verder houdt men rekening met de wenschen van pag. 281. Men moet, daar het oog zelf $\pm 500 \mu$ lang is, een stuk AB in het uitgetrokken deel hebben, dat ± 1 mm lang is en $\pm 75 \mu$ dik. Doorgaans zal dit stuk iets dunner uitloopen, maar veel mag dit toch niet zijn. De glasdraad wordt, als het uiteinde bij de verdere bewerking hinderlijk lang zou zijn, op een punt C, dat $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ mm voorbij B ligt (Fig. 111), met gloeidraad no. 3 afgeknapt. Erg nauw luistert deze afstand niet; soms breekt de draad reeds onder het uittrekken op een goed punt af. Daarna maakt men de opstelling van Fig. 112.

R is gloeidraad no. 2, ABC (de letters correspondeeren met die in Fig. 111) de glasdraad, S het staalplaatje. Men verplaatst dit iets in de richting van de pijl, zoodat in den glasdraad een bocht ontstaat en sluit den stroom. De bocht wordt daardoor gefixeerd. Dit wordt, met gedurige verplaatsing van het staalplaatje en van het statief met de glasstaaf, herhaald, zoodat de glasstaaf steeds verder wordt omgebogen (Fig 113—115) en eindelijk het omgebogen gedeelte bijna tegen het dikke deel stuit. Dan wordt met gloeidraad no. 3 de glasdraad afgeknapt op 500 μ afstand van de bocht, dus ongeveer ter hoogte van B



Pl. 13 (Fig. 101—113).

(Fig. 116). Dit geschiedt door herhaalde malen den stroom te sluiten, totdat de glasparel van den gloeidraad flink versmolten is met den glasdraad. Daarbij drukt men den glasdraad in de richting van de pijl (Fig. 116). Doet men dit niet, dan zal de platinadraad, als ze bij afkoeling naar rechts terugtrekt, den glasdraad meenemen en een bocht maken volgens Fig. 117. Nu ontstaat er echter een indeuking volgens Fig. 118. Daarna zet men het staalplaatje zijdelings tegen den glasdraad en beweegt het in de richting van de pijl, waardoor de glasdraad even boven de indeuking afknapt (Fig. 119). Ten slotte wordt het oog, door het op eenigen afstand voorzichtig te verwarmen met gloeidraad no. 2, tot op een kleine opening na dicht gedrukt (Fig. 120*); is de draaddikte ter plaatse van * 75μ , dan neemt men een opening van $\pm 30 \mu$.

Daarna wordt het oog in den goeden stand gebracht, n.l. zoo, dat het een hoek van ongeveer 10° zal maken met het dekglas en wordt de bocht gemaakt, die de vrije beweging door de zijspleet van de isoleerkamer mogelijk maakt. Wij beginnen met het laatste. Het oog wordt daartoe bij zwakke vergrooting zuiver horizontaal gesteld; de glasnaald is hierbij met den ruiter F van 50 g verzwwaard. Dan brengt men op 12 cm afstand van het uiteinde in loodrechten stand een richtplaatje aan en wordt het uiteinde van ± 5 mm boven de microvlam omgebogen. Ten slotte wordt het oog zelf onder het microscoop omgebogen, totdat bovengenoemde hoek van 10° is verkregen. Beide geschiedt, *mutatis mutandis*, op dezelfde wijze als dit voor de grove punt-naald (zie blz. 285) is aangegeven. Het uiteinde van de naald heeft dan den vorm van Fig. 121, waarin PQ het oog voorstelt.

Nu kan het oog op zijn bruikbaarheid beproefd worden. Hierbij zal blijken, dat de afmeting van de opening * een voorname factor is. In het algemeen mag deze niet te klein zijn en nog minder mag het oog geheel gesloten zijn. In dat geval toch neemt het wel gemakkelijk een organisme in zich op, maar zet het niet gemakkelijk zijn inhoud tegen het glas af; het tracht zoo lang mogelijk het laatste spoor vloeistof als een dun vliesje achter te houden. Gevoelige organismen kunnen dit niet verdragen; isoleert men b.v. in zulk een oog een infusiediertje, dan zal dit in het dunne vliesje barsten. Is de opening te groot, dan neemt het oog zeer moeilijk vloeistof en organismen op en is daardoor onbruikbaar. Is de opening van de juiste afmeting, dan

neemt het behoorlijk vloeistof en organismen op en geeft het reeds bij de eerste aanraking met het dekglas bijna den ganschen inhoud af en bij een tweede aanraking de rest, terwijl zich nooit een vliesje vormt. Een te groote opening wordt kleiner gemaakt volgens de opstelling van Fig. 120; een te kleine opening wordt grooter gemaakt volgens de opstelling van Fig. 132, waarin men echter het fijne verplaatsbare staafje vervangt door het grove. 't Is duidelijk, dat de goede afmeting van de opening samenhangt met de verhouding tusschen de dikte van den draad en de breedte-maat van het lumen (lieft 2 : 3) en dit laatste weer met de scherpte van de bocht bij D (Fig. 120), die bij het ombuigen verschillend kan uitvallen. Men heeft dit laatste nooit volkomen in de hand en zal de bruikbaarheid van een oog altijd even experimenteel moeten vaststellen. Vooral is dit het geval met het middensoort- en het kleine oog, welke speciaal voor het isoleeren worden gebruikt.

Wordt een naald nog niet direct in gebruik genomen, dan laat men het richtplaatje er op zitten, omdat het later bij het plaatsen in den naaldhouder nog dienst kan doen (zie pag. 302).

Bij de laatste afwerking van het oog blijkt het deel, dat door de indeuking naar binnen gebogen is, van nut te zijn; vaste deeltjes (sporen, enz.) blijven n.l. gemakkelijker vastklemmen in een hoek, zooals van Fig. 122, dan van Fig. 123. Bij de bewerking van Fig. 112—Fig. 120 is het van belang, dat de glazen lus, dus de stukken AD en BD (vgl. Fig. 120) in één vlak blijven. De glasstaaf is daartoe van den aanvang af voorzien van het caoutchouc schijfje G. Af en toe draait men daarmede de staaf zoo, dat de lus verticaal komt te staan, waardoor een eventueele afwijking duidelijk wordt. Men drukt dan met het staalplaatje tegen B en verwarmt, met gloeidraad no. 2 op eenigen afstand (Fig. 124, waarin AD, als dieper of hooger liggend, gestippeld is aangegeven), totdat AD en BD boven elkaar staan. Bij de laatste contrôle, dus na de afwerking tot Fig. 120, blijkt er nog wel eens een afwijking uit het vlak te zijn. Als deze gering is, kan ze blijven bestaan, vooral wanneer het afwijkende deel niet aan den bovenkant van het oog komt en dus het dekglas raakt, maar aan den onderkant.

H. Middensoort isoleeroogen.

Deze worden in hoofdzaak op dezelfde manier gemaakt als

de groote. Men vergelijke dus Fig. 111—121, waarbij echter op de volgende wijzigingen gelet wordt:

De glasstaaf wordt, daar de draaddikte $\pm 25 \mu$ moet zijn, bij het uittrekken verzaamd met den ruiters van 50 g. Daar het oog $\pm 150 \mu$ lang is, moet in het uitgetrokken deel een stuk AB (vgl. Fig. 111) voorkomen van genoemde dikte en $\pm 300 \mu$ lengte. Ook hier is een iets dunner uitloopen toelaatbaar. Men breekt met gloeidraad no. 3 den draad af op een punt C, dat ongeveer $\frac{1}{2}$ mm van B verwijderd ligt. In den toestand van Fig. 116 wordt de glasdraad afgeknapt op 150μ afstand van de bocht. De beste verhouding tusschen draaddikte en breedtemaat van het lumen is hier ook weer ongeveer als 2 : 3; het lumen zal dus $\pm 125 \times 40 \mu$ bedragen. De opening * ongeveer 10μ .

Nadat het laatste stuk van 5 mm boven de microvlam is omgebogen, wordt tenslotte het oog zelf (desverkiezend met een stukje aangrenzend draad, tezamen ter lengte van 400 à 500 μ) onder het microscoop gebogen, tot de hoek van $\pm 10^\circ$ met het dekglas verkregen is.

J. Kleine isoleeroogen.

De draaddikte van het kleine oog en de grootste breedte van het lumen zijn liefst van dezelfde afmeting, n.l. 8μ of, als men het oog wat grooter wenscht, 9 of 10μ (Fig. 125). Kleine afwijkingen hinderen hier intusschen niet; een oog, waarvan de draaddikte staat tot de grootste breedte van het lumen als 1 : $1\frac{1}{2}$, is ook nog goed bruikbaar en voor grootere cellen zelfs meer gewenscht. Men vervaardigt het op de volgende wijze:

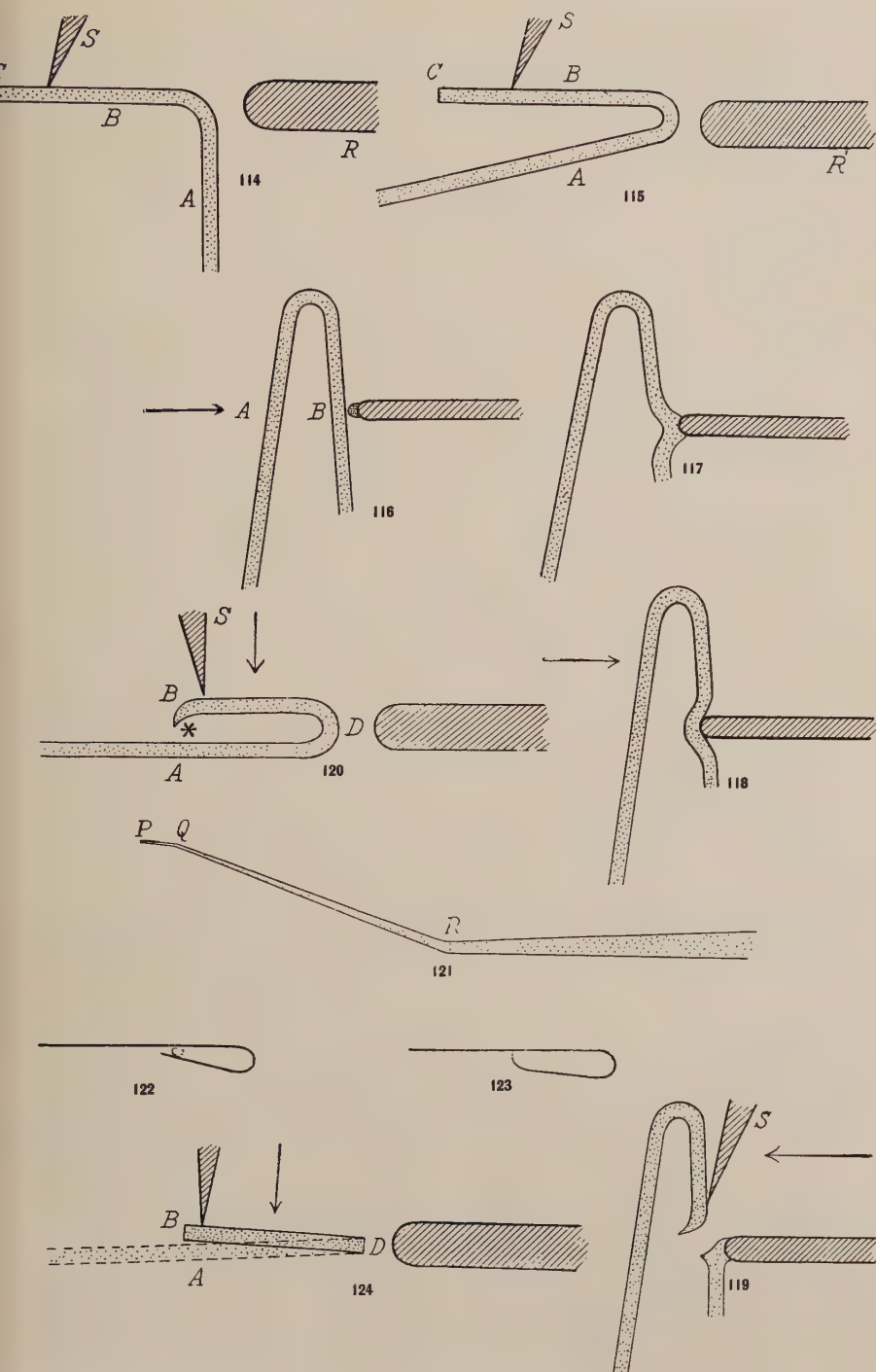
De glasdraad, die over een lengte van 75μ ongeveer de voor het oog vereischte dikte moet hebben (zie over de twee manieren, waarop dit verkregen kan worden, pag. 282) wordt met gloeidraad no. 3 afgebroken, daarna voorzien van het caoutchouc schijfje G en, verzaamd met den ruiters F van 50 g, in het rechterstatief gelegd. In het linkerstatief gloeidraad no. 4. De stand van beide is zoo, dat de punt van den glasdraad, wanneer die in de richting van de pijl wordt bewogen (Fig. 126), juist het platina aanraakt, wanneer dit zacht wordt verwarmd en daardoor uitzet (Fig. 127). Deze beweging wordt uitgevoerd met het draadje J (Fig. 74), waarmede men echter niet in de richting van den glasdraad trekt, zooals bij de vervaardiging der punt-

naalden, maar in een richting loodrecht daarop, naar zich toe. Daardoor zal in den naalddrager een kleine torsie ontstaan, juist voldoende voor deze beweging. Is de naald onder het platina gekomen (Fig 128), dan verbreekt men den stroom. Het platina trekt iets terug, zoodat men den glasdraad kan doen terugkeeren tot den vorigen stand er boven, zonder het platina aan te raken. Men herhaalt deze beweging tot de glasdraad den vorm heeft van fig. 129, er voor zorgend, dat het omgebogen deel $\pm 35 \mu$ lang is. Daarna wordt niet meer met het draadje J gewerkt, maar de platinagloedraad zoo dicht bij den glasdraad gebracht, dat deze bij zachte verwarming het omgebogen eind juist even aanraakt en verder doet omkrullen (Fig. 130). Hier kan niet voorgeschreven worden, waar men de krul moet raken, om te zorgen, dat het lumen niet te groot of te klein wordt. 't Is duidelijk, dat een aanraking in c een grootere bocht, een aanraking in b een kleinere bocht veroorzaakt. Dit is een kwestie van oefening.

Op deze wijze wordt het oog dichtgeduwd tot er een opening blijft van $\pm 5 \mu$. Deze opening moet ten slotte 1 à $1\frac{1}{2} \mu$ worden. Grooter mag ze in geen geval zijn, omdat het oog dan niet gemakkelijk cellen opneemt; geheel gesloten mag het oog ook niet wezen (pag. 293). Dit laatste dichtdrukken (Fig. 131) moet daarom zeer voorzichtig geschieden, liefst onder iets sterkere vergrooting, b.v. Leitz obj. 5. De stroom wordt zoo zwak genomen, dat de glasdraad eerst na *langere* aanraking week wordt en men deze *langzaam* ziet doorbuigen. Men controleert af en toe met een sterk droog systeem. Mocht het later, bij het gebruik van de naald, blijken dat de opening iets te klein is, dan is terugbuigen nog altijd mogelijk, volgens Fig. 132; ook hier geeft de pijl de richting aan, waarin het fijne verplaatsbare staafje x drukt. Het plaatsen van het oog om de punt x en de verwarming, moet hier wel zéér voorzichtig gebeuren.

Onder de bewerking van Fig. 130 en 131 kan het gemakkelijk gebeuren, dat de draad een gebogen vorm aanneemt. Men krijgt den rechten vorm terug door het verplaatsbare glasstaafje x tegen het oog te zetten en zacht met den verwarmden platina-draad te drukken (Fig. 133).

Hierna wordt het richtplaatje aangebracht en het laatste deel van 5 mm boven de microvlam omgebogen. Vervolgens wordt het oogje in een bijna horizontalen stand gebracht op de wijze,



Pl. 14 (Fig. 114—124).

zooals die is aangegeven voor de fijne puntnaald (pag. 286). Onder bijna horizontaal moet men dan verstaan een stand, waarbij de achterzijde van het oog $B \pm 6 \mu$ lager ligt dan het uiteinde A (Fig 134). Tenslotte krijgt de geheele naald dus ongeveer den vorm van Fig. 121, waarin PQ ditmaal omvat het oog + een stukje glasdraad, tezamen $\pm 200 \mu$ lang en in één rechte lijn liggend en PQR weergeeft de 5 mm, die boven de microvlam zijn omgebogen. Men zou hier ook wel het kleine oog alleen kunnen ombuigen, zooals dat voor het groote oog is beschreven, maar het is niet zoo gemakkelijk om dit precies op de grens tusschen oog en rechten glasdraad te doen.

Wenscht men nog kleiner oog dan het hierboven beschrevene, dan kan dat op dezelfde wijze vervaardigd worden. Het verdient dan echter aanbeveling den draad niet met den microbrander alleen uit te trekken, maar het dunne deel met den gloeidraad, zooals dat op pag. 282 is aangegeven. Zodoende krijgt men althans spoediger een uiteinde van b.v. 5μ dik. Met een oog van ruim 5μ draaddikte, een lumen van 8μ en een opening van $1\frac{1}{2} \mu$, isoleert men zeer gemakkelijk bacteriën; 't heeft het voordeel, dat het zeer kleine druppels afzet, b.v. met een diam. van 7μ .

Men moet onder de bewerking van Fig. 126—131 gedurig controleeren of het omgebogen deel nog in een plat vlak ligt. Blijkt er een afwijking te zijn, doordat het begin van een spiraal is ontstaan, dan gaat men niet verder voor dat men de glasstaaf 90° heeft gedraaid en bij zeer zachte verwarming door drukken met den platinadraad de krul in een plat vlak heeft gebracht. Bij deze standveranderingen doet het caoutchouc-schijfje G goeden dienst.

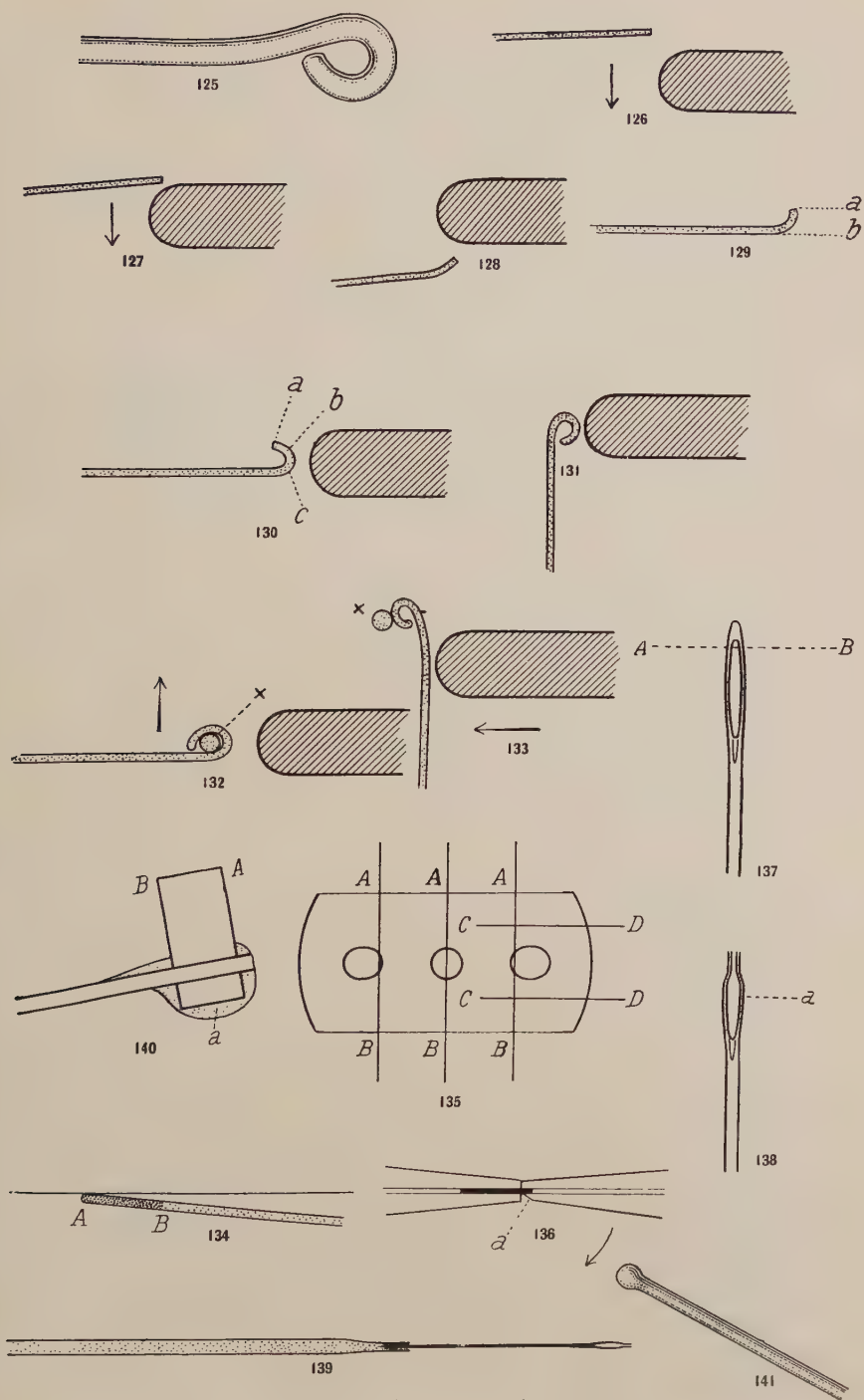
K. Micromessen van staal.

Grootere objecten (dikke weefsels, klierharen van planten, Filariën, enz.) kunnen niet met het micro-mesje van glas worden gesneden. Hiervoor gebruikt men een stalen mesje, groot $\pm 1 \times 2$ mm.

Van een Gillette-mesje (van verschillende onderzochte soorten vond ik bij het echte, oorspronkelijke Gillette-mesje den mooiste scherpen kant) worden met behulp van breede buigtangen stukken afgebroken, volgens de lijnen AB (Fig. 135). Voor de verdere bewerking heeft men noodig 2 platte buigtangen van

3 à 4 mm breedte en een stevig fijnpuntig pincet. Van deze buigtangen moeten de uiteinden van den bek — de gedeelten dus waartusschen het voorwerp wordt gegrepen — aan den binnenkant glad gevijld zijn; bovendien is een van de twee aan een der buitenkanten nog schuin gevijld (Fig. 136). Met de smallere buigtang worden nu langs de lijnen CD strookjes van ± 5 mm breedte afgebroken (Fig. 135). Men vat zulk een strookje tusschen de 2 smalle buigtangen, volgens Fig. 136 (vergroot) en breekt strookjes af, die een scherpen kant hebben van 1 mm. Het schuine deel a maakt het mogelijk de buigtangen tegen elkaar te zetten en een er van om te buigen; daardoor breekt het staal precies op de grens af en heeft men dus de zekerheid, dat het strookje niet veel van de vereischte breedte van 1 mm afwijkt. Het smalle strookje vat men tusschen de smalle buigtang en breekt er met het pincet een stukje af van 2 mm lengte. Bij al deze bewerkingen zorgt men er voor, dat de scherpe kant van het mesje, teneinde beschadiging te voorkomen, altijd buiten tang en pincet uitsteekt.

De messtukjes worden bevestigd aan het eind van een fijne stopnaald, lang ± 6 cm, dik $\pm 0,6$ mm. Men ontleemt het oog zijn hardheid in de spaarvlam van een Bunsen-brander en knijpt dan het einde (Fig. 137 langs AB) er af; daarna buigt men de uiteinden van het aldus verkregen vorkje over een lengte van 1 à 2 mm naar elkander (Fig. 138). Dan wordt de naald met zegellak in een uitgetrokken capillaire buis bevestigd, zoodat het geheel, evenals alle naalden van den micromanipulator, 16 cm lang is (Fig. 139). Nu vat men het messtukje met de fijne pincet, ontvet het in benzine, evenals het vorkje en steekt men het onder einde eerst in het wijdere deel a van het vorkje, om het dan in het nauwere deel te trekken. Voor blijvende bevestiging gebruikt men een dikke oplossing van celluloid in amylacetaat. Men strijkt het vorkje met het onder einde van het messtukje over de oppervlakte van deze kleefstof, zoodat er juist voldoende achterblijft om beide aan elkaar te kitten (Fig. 140). Terwijl de celluloid nog week is, wordt de snijnaald in horizontalen stand in een statief geklemd en onder contrôle van de loupe het mesje zoo gesteld, dat de uiterste punt A iets hooger staat dan de punt B (Fig. 140). Dit geschiedt uit de volgende overweging: Men kan de gewone snijbeweging maken, d.w.z. het mes trekken door het weefsel, terwijl dit met het micropincet



Pl. 15 (Fig. 125-141).

wordt vastgehouden. Het mes zal dan beter snijden als de scherpe kant een hellenden stand heeft. Men kan ook met het mes in loodrechte richting drukken tegen den onderkant van het weefsel. Daarbij zal de stopnaald een weinig gekromd worden en het mesje niet meer met punt A alleen, maar met de volle lengte van den scherpen kant het dekglas raken.

Wanneer men met het mesje werkt en het dus in loodrechten stand staat, ziet men den scherpen kant het best bij wijdgeopende iris.

Men verzuime niet het mesje, zoodra de celluloidoplossing na de vervaardiging hard is en ook steeds na het gebruik (in dat geval na afspoelen in benzine), te dompelen in paraff.liquidum. Daardoor wordt roesten voorkomen. Ook reservestukjes worden in een Petri-schaaltje onder par.liq. bewaard.

L. O e f e n n a a l d.

Deze is gemakkelijk te vervaardigen. Fig. 141 geeft den vorm aan. De glasdraad wordt afgebroken op een dikte van $\pm 15 \mu$. Men brengt het uiteinde dicht tegenover gloeidraad no. 2 en verhit deze kort, maar vrij sterk, er voor zorgend, dat beide elkaar niet raken. Door de verhitting wordt het uiteinde vervormd tot een kogeltje, dat men op een grootte brengt van $\pm 25 \mu$ diam. Daarna boven de microvlam ombuiging van de laatste 5 mm naar boven.

De naaldenvoorraad wordt bewaard in een plat kistje, zoo dat ze elkander niet kunnen aanraken en de punten iets hoger en dus vrij staan. Als men ze nummert, kan men een korte beschrijving aanleggen van den voorraad. Wie bang is voor verweeren bij hooge tropentemperatuur, kan de punten in par.liq. doopen.

Wanneer men na het werken met den microcauter de naaldstatieven weer op het micromanipulator-voetstuk plaatst, lette men er op, dat bij een gemiddelden stand der schroeven A en B (3 mm uitgedraaid) de centra van de ronde en van de elliptische gaten in een rechte lijn liggen (te meten met een gespannen koordje). Het stellen en vooral het omwisselen der naalden wordt n.l., wanneer men met 2 naalden tegelijk wil werken, moeilijker als de eene elliptische opening hoger en de andere lager staat.

Men zal tenslotte de vraag stellen: is het vervaardigen van

de naalden niet een werk, dat te veel tijd kost en is inzonderheid het maken van de oogvormige naalden niet een kunst, die slechts voor microtechnisch zeer ontwikkelde personen is bestemd. Hierop kan ik uit ervaring een antwoord geven. Puntvormige naalden kan ieder vrij spoedig maken en ook de glazen messen leveren niet veel moeite. Ik herinner mij hoe een onderzoeker, aan wien ik den microcauter demonstreerde, het zonder eenige hulp nadeed en binnen een kwartier mij een voortreffelijk micromes toonde. ¹⁾ Het vervaardigen van de oogvormige naalden vordert echter meer dan gewonen aanleg voor fijn werk; verder kalmte, geduld en bovenal strenge zelfcritiek. Men zij niet te spoedig tevreden!

M. Het plaatsen der naalden in den micro-manipulator.

1. Draai de schroeven A en B. (Fig. 4) van uit hun diepsten stand 3 mm terug, waardoor ze ongeveer in hun gemiddelden stand komen. (Bij het pincet en de loodrechte snijnaald en verder bij de mesjes en andere naalden, die men speciaal tegelijk met het pincet wil gebruiken, draait men de schroeven 6 mm uit. Zie nader pag. 241).
Stel de schroeven van het elliptische gat van L zoo, dat de ronde staaf van M in het midden komt.
2. Zet het microscoop midden tusschen linker- en rechternaaldstatief, te meten aan den afstand tusschen objecttafel en elliptisch gat van L en zoo, dat de middens van de ronde gaten in L en van de opening in de objecttafel in één rechte lijn liggen; zet het daarna vast met 2 klompjes plasticine.
3. Draai C zoo diep, dat nog één omwenteling noodig zou zijn om het achtereind van L op H te doen rusten.
4. Leg in naaldhouder M, nabij de uiteinden, 2 stukjes plasticine ²⁾, ongeveer 1 cm lang en 3 mm hoog, druk die goed aan, zet de ringen N zoo hoog mogelijk vast en bevestig M in L zoo, dat M ongeveer 1 cm hooger komt dan de objecttafel van het microscoop en nauwkeurig parallel loopt met L.

¹⁾ Dit was intusschen een ervaren micrurg, nl. Prof. Chambers.

²⁾ Er zijn verschillende soorten plasticine in den handel. Voor ons doel moeten wij een preparaat hebben, dat goed vastkleeft aan metaal en glas en niet hard wordt. Deze eigenschappen bezit Harbutt's plasticine (Bathampton, Bath).

5. Bevestig de isoleerkamer, zonder de mica-brugjes, aan het microscoop. Leg de glasnaald (voorzien van richtplaatje, dat bij juisten stand verticaal naar boven wijst) op de plasticine, zoodat ze zuiver naar het midden van het objectief wijst en met de punt, bij zwakke vergrooting, midden in het gezichtsveld komt; druk dan de naald, terwijl men M met de hand ondersteunt, dieper in de plasticine, er voor zorgende, dat aan de laatstgenoemde voorwaarde voldaan blijft.
6. Licht de naald stevig gevat in de plasticine (ongeveer 1 mm boven den bodem van M), neem dan het microscoop weg, zoodat men de naald vrij van terzijde kan zien. Druk daarna, indien dit noodig is, het achtereind zoo diep in de plasticine, dat het voorste vrije deel iets naar boven gericht is en wel zoo, dat de as van het uiterste deel, onmiddellijk voor de opwaartsche bocht (Fig. 95, B) ongeveer 1 mm hooger staat dan de as van het deel boven de veer K (Fig. 4). Bij dezen stand is men er zeker van, dat de naald tot in de verste uithoeken van de isoleerkamer het dekglas kan raken.
7. Zet het microscoop weer op zijn plaats midden tusschen de naaldstatieven. Leg een dekglas op de isoleerkamer, zoodat deze voor $\frac{1}{3}$ is bedekt en wel bij het instellen van een linkernaald aan de rechterzijde, bij het instellen van een rechternaald aan de linkerzijde. Laat M dalen, steeds parallel blijvend met L, tot de punt van de naald even hoog komt als de onderzijde van het dekglas. Men controleert dit bij zwakke vergrooting. Daarna wordt de mica-brug op de spleet gelegd en vastgesteld, dat de onderkant van de naald vrij ligt in de spleet, ook wanneer C $2\frac{1}{2}$ omgang naar boven is gedraaid. Tenslotte laat men de ringen N dalen tot ze op L rusten en schroeft ze — eens voor altijd — in dien stand vast.
Men zal bemerken, als men M daarna in het statief aan de andere zijde van het microscoop plaatst, dat de punt van de naald meestal niet in het midden van het gezichtsveld komt. Dit kan het gevolg zijn van een kleine onnauwkeurigheid, begaan bij de plaatsing van het microscoop (niet volkomen in het midden), of bij het richten van de naald, of van een meer of minder aandraaien der schroeven in L. Een der oorzaken is zeker ook, dat bij de vervaardiging van het apparaat niet gestreefd is (wilt onnoodig!) naar absolute symmetrie. Hoe het

zij, een bezwaar levert zulk een afwijking in 't geheel niet op. Bestaat ze in de richting links-rechts, dan wordt ze gecorrigeerd door middel van de schroef A; een afwijking in de richting voor-achter door middel van de schroef B, indien ze klein is en door middel van de schroeven in het elliptische gat van L, indien ze groot is. Deze correctie-middelen zijn voldoende, want met A kan men de punt der naald over ± 2 mm verplaatsen, met B over $\pm 1\frac{1}{2}$ mm, met de schroeven van het elliptische gat ruim 10 mm. Deze verplaatsingen behoeven zoo weinig mogelijk te gebeuren, wanneer men de naalden instelt in dat statief, waarin ze het meest gebruikt worden. Zooals reeds op pag. 213 is medegedeeld, wordt dus de grove punt (no. 5) en het pincet aan den rechterkant ingesteld en de andere naalden aan den linkerkant.

Wanneer men met 2 naalden tegelijk werkt, is het gewenscht ze zoo te plaatsen en gedurende het werk te houden, dat de punten bij zwakke vergrooting in één gezichtsveld vallen, maar niet recht tegenover elkaar, waardoor ze in elkaar verward zouden kunnen raken. Bij oogvormige naalden is het verder van belang er voor te zorgen, dat het oog volkomen horizontaal staat en dus in zijn vollen omvang het dekglas raakt. Men controleert dit door het oog in den druppel te vullen, naast den druppel een druppeltje er mee af te zetten en dan weer langzaam naar beneden te bewegen; men ziet dan welk gedeelte het laatst het dekglas loslaat. Een horizontalen stand bereikt men door het richtplaatje iets te verdraaien, wat mogelijk is, omdat dit zich vrij tusschen de plasticine-stukjes bevindt.

Ten slotte laat men het richtplaatje van de naald vallen door het bovineind te verhitten; daarna wordt M met de bijbehorende schuif van boven afgesloten.

Ik mag deze verhandeling niet eindigen zonder een woord van dank aan wijlen Prof. Dr. F. A. F. C. Went en wijlen Prof. Dr. C. Eykman, die mij beiden in hun laboratoria de gelegenheid gaven dit werk te beginnen en voort te zetten.

In 't bijzonder ben ik Prof. L. K. Wolff, Directeur van het Hygiënisch Laboratorium, waar ik den arbeid mocht voltooien, erkentelijk voor zijn aanmoedigende belangstelling.

Verslag der Vergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie,

gehouden Zaterdag 23 November 1935 in het Hygiënisch
Laboratorium te Utrecht.

Te half elf opent de voorzitter, *Prof. Flu*, de vergadering en geeft het woord aan den secretaris tot het voorlezen der

Ingekomen stukken.

Van de redactie van het tijdschrift is het verzoek ontvangen om een bijdrage van ten hoogste f50 toe te staan voor de verzorging van de eerstvolgende aflevering. Deze zal, als een afgesloten geheel, uitsluitend bevatten een uitvoerige verhandeling van *Dr. Schouten* over de micromanipulatormethode, aan welke publicatie hogere kosten zijn verbonden voor het opnemen van afbeeldingen.

Op voorstel van het bestuur wordt het toestaan van deze bijdrage goedgekeurd.

Verder is ingekomen het verslag over 1934 van de „Nederl. Centrale Organisatie voor toegepast natuurwetenschappelijk Onderzoek” en tenslotte is van de redactie van het Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde het aanbod ontvangen om hare bemiddeling te verleen en bij het bepalen van de vergaderingen; dit om te voorkomen, dat verschillende vereenigingen op het gebied der geneeskunde en aanverwant terrein op denzelfden dag zouden samenkomen. Door het bestuur is geantwoord, dat het bereid is deze bemiddeling te aanvaarden, onder het voorbehoud van de noodige vrijheid van handelen. De vergadering vereenigt zich hiermede.

Overeenkomst Tijdschrift.

De overeenkomst met de firma *Swets en Zeitlinger*, ingegaan 1933, loopt aan het einde van dit jaar af. Het tijdschrift

voldoet blijkbaar aan de gestelde verwachting; bij het bestuur is althans hierover geen enkele klacht ingekomen. Voorgesteld wordt daarom, deze overeenkomst voor den duur van twee jaar te verlengen. Aldus wordt besloten.

Contributie gewoon lidmaatschap.

In de laatste zomervergadering is de mogelijkheid ter sprake gebracht om de bijdrage der gewone leden met 10% te verlagen. De penningmeesteres heeft hiertegen geen bezwaar: bij een op dezen grondslag opgemaakte begrooting kon ook nog een kleine post voor onvoorzien worden geraamd.

Op een vraag van *Dr. Tasman*, of het niet noodig is eerst meer geld beschikbaar te stellen om aan het tijdschrift verdere uitbreiding te geven, antwoordt *Dr. Timmerman*, sprekend namens de redactie, ontkennend. In verband met de beschikbare copy bestaat aan deze uitbreiding geen behoefte.

Op voorstel van het bestuur wordt daarna besloten de contributie der gewone leden voor 1936 te bepalen op f9.—. Voor het daaropvolgende jaar zal nader worden beslist.

Verkiezing bestuurslid.

Aan het einde van dit jaar is *Dr. J. Smit* aan de beurt van aftreden. Als diens opvolger wordt gekozen *Dr. T. Folpmers*, welke zijn benoeming aanneemt.

Kascommissie.

Als leden der commissie tot het nazien van de kas worden aangewezen *Dr. H. W. Julius* en *Dr. A. Pondman*; beide heeren verklaren zich bereid deze taak op zich te nemen.

Zomervergadering.

Besloten wordt de volgende vergadering te houden op Zaterdag 23 Mei a.s. te 's-Gravenhage, zoo mogelijk in het Ziekenhuis aan den Zuidwal.

Daar bij de *Rondvraag* niemand het woord verlangt, kan worden overgegaan tot het

Wetenschappelijk programma.

Dr. T. Folpmers opent de rij der sprekers met het onderwerp: *Vergelijkende resultaten, verkregen met oppervlaktewater in verschillende reinigingsstadia, door vervanging van pepton door glutaminezuur enz. bij de Eijkmanproef.*

Deze voordracht is in haar geheel in dit nummer opgenomen.

Bespreking.

Spreker antwoordt op een vraag van *Prof. Grijs*, dat, wanneer men in ruw water geen coli maar wel boterzuurbacteriën vindt, men deze niet mag beschouwen als te zijn afkomstig van faecale verontreiniging, en zegt, het als een nadeel van de Eijkmanproef te achten, dat deze ook de boterzuurgisting aangeeft.

Dr. Smit uit zijn waardeering voor het vele werk, dat door *Dr. Folpmers* is verricht en vraagt, of ammoniumlactaat ook door natriumlactaat mag worden vervangen.

Dr. Folpmers zegt, dat hij heeft genomen wat hier verkrijgbaar en tevens goedkoop is.

Dr. Smit deelt verder mede, dat hij glutaminezuur uit Japan heeft gekregen, een goed en een goedkoop product en zegt, dat hij een andere meening heeft over de waarde der boterzuurgisting dan *Dr. Folpmers*: de boterzuurbacteriën uit den grond zijn geheel anders dan die uit water.

Spreker antwoordt, dat de zuiverheid van het glutaminezuur van groot belang is. In Japan en in China bestaan groote fabrieken voor de bereiding, omdat deze stof daar, vermengd met rijst en andere voedingsmiddelen, in reusachtige hoeveelheden wordt gegeten ter vervanging van vleesch.

Op de vraag van *Dr. Kauffmann*, of gewerkt is bij 37° antwoordt spreker ontkennend; men krijgt dan te veel moeilijkheden.

Dr. J. W. Pette houdt daarna een voordracht over *Eenige afwijkende melkzuurbacteriën.*

Het schema van *Orla Jensen* voor de indeeling der melkzuurbacteriën voldoet aan de practische bruikbaarheid, doch het is geen zeldzaamheid, dat men typen aantreft, die in gering opzicht hiervan afwijken.

Spreker behandelt eenige typen, die belangwekkende af-

wijkingen vertoonen in verband met het vraagstuk van de vorming van het boteraroma.

Het ontstaan van dit aroma wordt toegeschreven aan de samenwerking van melkzuurstreptococcen en -betacoccen, waarbij de eerste door hun snelle vorming van melkzuur de melk of den room een geschikten zuurgraad doen verkrijgen, terwijl de betacoccen het in de melk voorkomende citroenzuur omzetten onder de vorming van vluchtige zuren (azijnzuur, koolzuur), acetylmethylcarbinol en het oxydatieproduct hiervan, het diacetyl, welke laatste stof het hoofdbestanddeel van het aroma vormt.

Het ééne door spreker behandelde type is een streptococcus (vorming van d-melkzuur), die het citroenzuur der melk onaangetast laat, geen azijnzuur en CO_2 doet ontstaan maar wel acetylmethylcarbinol en diacetyl, welke verbindingen dus hierbij uit suiker gevormd moeten worden. Het type zuurt de melk slechts langzaam en is voor de practische boterbereiding daarom niet van belang. Aan hun stikstofvoedsel stellen deze bacteriën, welke afgezonderd werden uit zure wei en kaas, opmerkelijk hooge eischen. Bij gebruik van andere media dan melk, zooals gistautolysaat-, caseïnepepton of pepton Poulenc met glucose en voedingszouten, treedt geen groei in. De vergisting der verschillende suikers werd nagegaan in vleeschbouillon met 2% suiker. Een der stammen wilde ook hierin niet groeien. De andere drie vergistten glucose, lactose en mannose. Niet vergist werden fructose, maltose, saccharose, galactose, rhamnose, raffinose, xylose, arabinose, dextrine, glycerine, sorbiet, manniet, inuline en salicine. Door de vorming van diacetyl bezitten de melkcultures van deze bacteriën een aromatischen geur, welke echter afwijkt van het aroma van boter. Door toevoegen van azijnzuur en bicarbonaat kon de geur van het boteraroma nagebootst worden. Deze geur bestaat dus vermoedelijk uit den geur van diacetyl en azijnzuur, verfrist met CO_2 .

In verband met de beschreven eigenschappen werd de naam „*Streptococcus aromaticus*” voorgesteld.

Een tweede type, uit handelsmelk afgezonderd, was volgens de eigenschappen een typische strept. lactis. Deze bacterie zet echter krachtig citroenzuur om onder de vorming van even groote hoeveelheden azijnzuur, koolzuur, acetylmethylcarbinol en diacetyl als de combinatie van een melkzuurstreptococcus

en een betacoccus in melk. Zij vereenigt dus de eigenschappen van deze samenvoeging in één. De betreffende bacterie geeft aan melk en room echter geen boteraroma doch een wrangen geur, welke aan deze bacterie eigen is.

Waar de voor deze bacterie passende naam „*Streptococcus citrovorus*” reeds in Amerika voor aromabacteriën gebruikt wordt, werd de naam „*Streptoc. citrophilus*” voorgesteld.

Bij de op de voordracht volgende *bespreking* vraagt *Dr Vorstman* eenige technische inlichtingen.

Op een vraag van *Dr. Smit* zegt spreker, dat deze bacterie voor de practijk geen beteekenis heeft.

Dr. A. P. Struyk geeft vervolgens een *demonstratie* van een door hem ontworpen toestelletje om de vorming van gas uit suikers door microörganismen aan te toonen. Het bestaat uit een 10 c.m. lang buisje met een slijpstuk, waarin een tweede buisje past, dat in een nauwe buis is uitgetrokken, die in de onderbuis steekt.

De geënte bacteriën kunnen zich in de vernauwde buis en in de onderbuis (= gistingsbuis) ontwikkelen en mogelijk gevormd gas wordt in het onderbuisje bij het slijpstuk opgevangen.

Spreker licht enkele voorbeelden toe, die dit toestelletje zou hebben boven de gebruikelijke gistingsapparaatjes, zooals Einhornkolfje, Durhambuisjes en stopfleschje. Deze voordeelen zijn:

1. bij langzame of geringe gasontwikkeling geen verlies door wegdiffundeeren door het open been;

2. de gevormde gashoeveelheid is goed waar te nemen, ook is gemakkelijk te zien of naast koolzuur nog waterstof aanwezig is, terwijl ook de verhouding hiervan goed kan worden bepaald;

3. opgelost gas kan eenvoudig worden aangetoond door uitschudden met lucht;

4. bij microörganismen, die uitsluitend aëroob groeien en alleen anaëroob gisten, is ook duidelijk gasvorming in de gistingsbuis waar te nemen (b.v. de gisten);

5. anaërobe gistingen kunnen zonder het gebruik van een vacuum exsiccator worden verricht. Men brengt nog een gewoon glazen kogeltje op de vernauwing ter betere afsluiting. Het

buisje kan door uitkoken goed van sporen lucht worden bevrijd.

6. bij ophooping (b.v. wateronderzoek) blijven de aërobe en de anaërobe bacteriën gescheiden, zoodat bij later afstrijken — na mogelijk waargenomen gasvorming — geen storing door aërobe organismen behoeft op te treden.

Bij grootere hoeveelheden te onderzoeken vloeistof wordt een gistingsfleschje gebruikt, waarbij de vernauwde buis slechts kort in het fleschje steekt. Ook hierbij is het glazen kogeltje noodig.

Aan de hand van proeven wordt een en ander toegelicht. O.m. kan hij laten zien met ontkleurde methyleenblauwoplossing hoe de zuurstof slechts zeer langzaam, na verloop van dagen, in het gistingsbuisje naar binnen dringt.

Nadat in de practicumzaal het noenmaal is gebruikt, spreekt in de middagvergadering *Dr. A. Pondman*, mede namens *Mej. N. G. Apken*, over *De bereiding van het M en N serum*. Deze voordracht is in haar geheel in dit nummer opgenomen.

Vervolgens houdt *Dr. W. A. Collier* (als gast) een voordracht over *Die Pneumokokkenimmunität der weissen Maus bei Pneumonie und Sepsis*.

Deze voordracht zal in haar geheel worden geplaatst.

Als laatste spreker doet tenslotte *Dr. T. Y. Kingma Boltjes* een mededeeling over *Een bij microorganismen tot nu toe onbekende wijze van vermeerdering*.

Aan de hand van tal van fraaie lantaarnplaatjes wordt een uiteenzetting gegeven van de ontwikkelingsgeschiedenis van *Hyphomicrobium vulgare*.

Het merkwaardige is, dat een deel van deze ontwikkeling submicroscopisch is. Door evenwel gebruik te maken van belichting in het donkere veld, is de groei van dit organisme goed te volgen. De wijze van vermeerdering van dit microorganisme wijkt zoozeer af van wat hiervan bij andere microorganismen is waargenomen, dat het op dit oogenblik niet mogelijk is *Hyphomicrobium vulgare* in het bestaande systeem in te deelen.

Bespreking.

Dr. Smit vraagt, of iets van de stofwisseling van dit micro-

organisme bekend is; misschien zou dit een aanwijzing kunnen geven voor de plaatsing.

Spreker antwoordt, dat vetzuren kunnen worden verbrand.

Op de opmerking van *Prof. Grijns*, dat de groeivorm gelijkt op dien van *mucor*, zegt spreker, dat de waargenomen draden niet het karakter hebben van een mycelium.

Na afloop van deze voordracht wordt, daar niemand meer het woord verlangt, te ruim vier uur de vergadering, die volgens de presentielijst is bijgewoond door 46 leden en 6 gasten, met dank aan den gastheer, *Prof. Wolff*, en aan de sprekers, door den voorzitter gesloten.

De secretaris,
H. J. van Nederveen.

's-Gravenhage, December 1935.

Over de bereiding van anti-M en anti-N testvloeistoffen.

DOOR

Dr. A. PONDMAN.

Plv. Dir. R.I.V.

MET MEDEWERKING VAN MEJ N. G. APKEN.

Analyste Bloedtransfusiedienst Roode Kruis.

In 1927 werden door Landsteiner en Levine (1) naast de reeds bekende haemagglutinogenen A en B een drietal andere gevonden. Bij het nagaan van verschillende sera van konijnen, die met menschenroodebloedlichaampjes waren ingespoten, was hun gebleken, dat na adsorptie van de bekende agglutinenen anti-A en anti-B door daarvoor specifieke roode bloedlichamen, nog andere agglutinenen overbleven, die zich met onbekende agglutinogenen konden binden. Deze laatste agglutinogenen werden door hun aangegeven met de letters M, N en P. De bereiding van een specifieke testvloeistof voor de beide eerstgenoemde agglutinogenen M en N zal het onderwerp van bespreking vormen.

Tusschen de agglutinogenen M en N en de beide andere n.l. A en B bestaat geen verband. Het is gebleken, dat deze twee groepen van agglutinogenen geheel onafhankelijk van elkander voorkomen. Verder bestaan er meerdere verschillen tusschen de beide agglutinogeenparen, waar wij hier echter niet op kunnen ingaan, daar het ons te ver van het onderwerp van onze bespreking zou afvoeren. Op één belangrijk punt moeten wij echter wel de aandacht vestigen, daar dit direct verband houdt met het feit, dat de genoemde specifieke M en N vloeistoffen niet bestaan, maar bereid moeten worden. Gelijk ons reeds bekend is, kan men in het menschelijk serum tegen de agglutinogenen A en B normaal agglutinenen vinden, de z.g. iso-haemaggluti-

ninen; dit is uitgesloten bij het M en N agglutinoëen. Slechts één uitzondering vonden wij vermeld door Wolff en Jonsson (2), waarin bij een normaal mensch een anti-M agglutinine werd aangetroffen.

Daar wij destijds de bereiding, of beter gezegd, het beschikbaar stellen van agglutineerende sera ten opzichte van de beide agglutinogenen A en B op ons hadden genomen, wat wij als taak van het toenmalige Rijks Serologisch Instituut beschouwden, besloten Dr. Timmerman en ik nu ook de bereiding van M en N sera ter hand te nemen. Hierbij kreeg ik een grooten steun van Mej. Apken, die als analyste door het Hoofdbestuur van het Roode Kruis aan de afdeeling Bloedtransfusie was toegevoegd, om behulpzaam te zijn bij de onderzoekingen voor de verschillende bloedtransfusiediensten. Wel is waar staan de anti-M en anti-N agglutinenen voorloopig nog in een verwijderd verband met de bloedtransfusie, maar toch zijn er enkele publicaties verschenen (3), waarin de vraag onder het oog wordt gezien, in hoeverre deze agglutinogenen M en N bij bloedtransfusies, vooral bij herhalingen er van bij één persoon, een rol zouden kunnen spelen.

Wij meenden dan ook uit dien hoofde de bereiding dezer vloeistoffen te moeten entameeren, om in het belang der bloedtransfusiediensten een onderzoek over de gerezen vraag mogelijk te maken.

Bij de bereiding der anti-M en anti-N vloeistoffen stonden wij voor een geheel ander probleem als bij de anti-A en anti-B sera, daar wij bij deze laatste eenvoudig konden uitgaan van sterk werkende menschen sera, waarin de bedoelde agglutinenen gepreformeerd, aanwezig waren. Bij de anti-M en anti-N vloeistoffen daarentegen moesten, zooals wij reeds zagen, deze agglutinenen worden opgewekt bij daarvoor geschikte proefdieren. Als doel werd door ons nagestreefd, zoo *hoogwaardig* mogelijke vloeistoffen te verkrijgen, die daarbij streng *specifiek* waren. Toen wij met de werkzaamheden waren aangevangen, kwam een omstandigheid ons tot meerderen spoed aanzetten. Het kwam ons toch van groot belang voor, om het mogelijk te maken, dat de heer Julien bij een reeds voorgenomen expeditie naar het gebied der Voltaïde-stammen in West-Afrika, nu niet alleen in staat zou zijn om waarnemingen bij de inheemsche bevolking te

doen, over de verspreiding der vier bekende bloedgroepen, O, A, B en AB, doch tevens over het voorkomen dezer M en N eigenschappen. Maar hiermede zagen wij ons nog voor een derden eisch gesteld, wat betreft de te bereiden sera, n.l. naast *goed werkzaam* en *specifiek* moesten zij ook de eigenschap bezitten, om hun *werkzaamheid over een betrekkelijk langen tijd onder tropische verhoudingen te bewaren*.

Deze laatste voorwaarde bracht de meeste zorg, aangezien in de literatuur veelal wordt opgegeven, dat de testvloeistoffen, waarmede de reacties op M en N moeten worden uitgevoerd, een sterke neiging vertoonen snel in werkzaamheid achteruit te gaan en bovendien, dat ze daarbij zeer gevoelig zijn voor hogere temperatuur. Toch koesterden wij den hoop, dat, wanneer het ons maar mocht gelukken, de titerwaarde der testvloeistoffen zoo hoog mogelijk op te voeren, dat dan, ondanks de bekende indaling der waarde, toch nog een voldoende periode zou bestaan, voor het doen van waarnemingen door Julien, voordat de testvloeistof geen duidelijke reacties meer zou opleveren.

Wat kon ons de literatuur aangaande de bereiding der anti-M en anti-N vloeistoffen leeren? Een belangrijke vraag, die zich hier voor ons op deed, was, een methode van bereiding te vinden, waarmede de beste en tevens zekerste resultaten te verwachten waren. De tijd toch, die ons nog ter beschikking stond voor het vertrek van Julien, was tamelijk kort, zoodat wij een eventueele mislukking niet mochten riskeeren. Wilden wij een vergelijkend onderzoek van de verschillende opgegeven methoden laten voorafgaan, dan ware het mogelijk, dat wij niet snel genoeg over hoog werkzame stoffen zouden kunnen beschikken.

In principe komt de bereiding dezer vloeistoffen hierop neer, dat men *konijnen* intraveneus inspuit met roode menschelijke bloedlichaampjes van het type M respectievelijk type-N. Bij deze dieren kan dan o.a. een anti-M, resp. anti-N serum worden gevormd, aangezien de agglutinogenen M en N antigenen zijn in den zin van Landsteiner. Bij deze bereiding ontmoet men vanzelfsprekend weder gelijke moeilijkheden, als bij opwekken van agglutinenen in het algemeen.

Dan eens ziet men bij een bepaalde behandelingswijze der

proefdieren een groot aantal gunstige resultaten, d.w.z. de verlangde sera bereiken in een groot percentage hoge titers, een volgende maal daarentegen, bij een oogenschijnlijk geheel gelijke behandeling, is de oogst miniem of zelfs nihil. Wij zijn er van overtuigd, dat hierbij vele factoren bestaan, die wij nog in het geheel niet begrijpen of beheerschen. Naast den individueelen factor der roode bloedlichamen, kunnen wij met zekerheid aannemen, dat het vermogen om immuunlichamen te vormen, bij de konijnen onderling sterk kan verschillen. Al gaat men uit van bloedlichamen met dezelfde agglutinogeenformatie b.v. MO, afkomstig van één bepaalden persoon, dan nog zullen de ermede te bereiken resultaten in twee geheel gelijke behandelingsreeksen bij twee verschillende groepen van konijnen, zeer sterk uiteen kunnen loopen. Als voorbeeld noemen wij verder dat, uitgaande van dezelfde MN roode bloedlichamen bij een aantal konijnen, een deel dezer dieren een goed anti-M serum vormt, terwijl bij een ander deel daarentegen, juist het anti-N agglutinine ver op den voorgrond treedt.

Ten slotte is natuurlijk ook de te volgen methode van inspuiting van belang. Op al de bovengenoemde moeilijkheden zal het dan ook wel berusten, dat men ook bij dit immunisatieproces in de literatuur nagenoeg evenveel verschillende werkwijzen aantreft, als het aantal onderzoekers, dat zich ermede heeft beziggehouden. Aanvankelijk werden de methoden niet al te nauwkeurig omschreven, sedert 1932 is dat echter zeer veel verbeterd.

Het zou ons te ver voeren, indien wij de verschillende werkwijzen, die er bestaan, aan een bespreking onderwerpen; bovendien zouden wij dan gedeeltelijk in herhaling vervallen van datgene, wat Posthumus (4) over dit onderwerp heeft geschreven.

Toch meenden wij, ondanks de bovengenoemde wisselvalligheid der methoden, aan één werkwijze de voorkeur te moeten geven en wel die, welke door Wiener in zijn handboek „Blood-groups and bloodtransfusion” wordt beschreven. Wiener had toch reeds de ervaring opgedaan, dat de oorspronkelijke werkwijze van Landsteiner soms zeer matige resultaten afwierp. Bij zijn onderzoek nam hij echter waar, dat deze zeer veel verbeterden, toen hij de konijnen meerdere reeksen van inspuitingen toediende. Het resultaat door Wiener bereikt, was van dien aard, dat het allereerst navolgen van zijn methode ons

alleszins gerechtvaardigd voorkwam. Aangezien de methode Wiener uitvoerig besproken zal worden bij onze serumbereiding, zullen wij er hier niet verder op ingaan.

Wat betreft de voor de inspuiting der konijnen te gebruiken menschenlijke roode bloedlichamen is men het er vrijwel over eens, dat men dergelijke roode bloedlichaampjes moet bezigen, die, zooals wij reeds opmerkten, naast het verlangde agglutinogeen M of N, geen A of B agglutinogeen bezitten. Zij zouden dus moeten behooren tot het type MO of NO. Op deze wijze zou men dan kunnen voorkomen, dat er bij de immuniseering met deze roode bloedlichamen tevens anti-A of anti-B agglutinine wordt opgewekt. Nu meenen wij echter toch te moeten opmerken, dat hoe juist deze opvatting eensdeels ook moge zijn, anderdeels erbij uit het oog wordt verloren, dat men bij het gebruiken van roode bloedlichamen van het type O, evenmin aan de moeilijkheden ontkomt. Ook deze type O roode bloedlichaampjes bezitten een agglutinogeen, dat men hetzij O, hetzij R kan noemen; in dit laatste geval nemen wij dus de letter, die Bernstein in zijn erfelijkheidstheorie gebruikt.

Waren wij aanvankelijk toch geneigd om aan deze O bloedlichamen een specifiek agglutinogeen te ontzeggen, latere onderzoekingen hebben ons geleerd, dat het tegendeel het geval is. Er bestaat wel geen iso-agglutinogeen, maar toch zeker een hetero-agglutinogeen.

Zoo hebben wij in navolging van Schiff het volgende experiment uitgevoerd. Wij zijn daarbij uitgegaan van runder-serum, dat wij geadsorbeerd hebben met bloedlichamen van de groep AB, waarmede dus het aanwezige anti-A en anti-B agglutinine uit dit serum verdween. Na volledige adsorptie van dit runder-serum bleef een specifieke agglutinatatie der O roode bloedlichamen over. Hiermede was een zeer duidelijk bewijs geleverd, dat deze O roode bloedlichamen ook een specifiek agglutinogeen bezitten. Wij meenen opgemerkt te hebben, dat het mogelijk is met dit specifieke anti-R serum het R agglutinogeen ook in de heterozygote AR en BR groep te kunnen aantoonen, waarop wij echter ter gelegener tijd hopen terug te komen.

Zeker is ten slotte, voor zoover het de bereiding der anti-M en anti-N sera betreft, dat wij bij het gebruik van MO of NO roode bloedlichamen indachtig moeten zijn, dat er zich neven-agglutininen kunnen vormen en wel van het type anti-R, even-

als bij het gebruik van MA en MB of NA en NB roode bloedlichamen anti-A of anti-B agglutinenen kunnen ontstaan.

Over het verschil in ontwikkeling bij konijnen van anti-M serum en anti-N serum, loopen de meeningen uiteen. Vinden wij aan de eene zijde door Landsteiner en Levine (5), Crome (6), Akune (7) en Jadin (8) opgegeven, dat het in 't algemeen moeilijker is anti-M serum met hooge titer te verkrijgen dan anti-N serum, daartegenover geeft Thomson (9) op, dat hij juist de minste moeite heeft met anti-M serum. En daartusschen in staat de meening van Posthumus (4), die geen verschillen heeft opgemerkt in de vorming bij deze beide agglutinesoorten. Hierbij is het niet geheel duidelijk of de eerst genoemde auteurs nu bedoelen het verkrijgen van *serum*, dan wel de bereide *testvloeistof*. Hebben zij het oog op deze laatste, dan kan men hieruit geen enkele conclusie trekken omtrent de specifieke agglutininevorming bij het konijn, daar de wassching hierbij van overwegenden invloed is. Hebben zij daarentegen het oog gehad op het eerste, het serum dus, dan komt het ons voor, dat dan evenmin over deze agglutininevorming met zekerheid iets is uit te maken, aangezien naast de specifieke factoren M of N nog andere eigenschappen der roode bloedlichamen een rol spelen. Hierop komen wij later terug bij de bespreking van onze eigen resultaten.

Bij de beschouwing over het anti-R agglutinine wezen wij er reeds op, dat door middel van adsorptie met daarvoor geschikte bloedlichamen n.l. van de groep AB, de anti-A en anti-B agglutinenen uit het runderserum verwijderd werden, terwijl dan tevens het soort-specifieke antilichaam werd weggenomen. Dit adsorptie-proces vindt ook zijn toepassing in het verkrijgen van de specifieke anti-M en anti-N testvloeistoffen. Wij spreken n.l. over het eindproduct als „testvloeistof”, aangezien, zooals ge zult opmerken, het oorspronkelijke serum wel sterk is gemodificeerd.

De, met b.v. MO roode bloedlichaampjes bereide anti-M sera, bevatten naast het anti-M agglutinine evenzoo het soort-specifieke antilichaam, dat alle roode bloedlichamen van welke groep ook tot agglutinatie zou kunnen brengen. Maar dat niet alleen, wij hebben reeds opgemerkt, dat men ook anti-R agglutinine kan verwachten, terwijl ten slotte uit de waarnemingen van Landsteiner (10) volgt, dat zich ook agglutinenen van allerlei anderen

aard, als anti-A, anti-B en anti-N kunnen gevormd hebben, de z.g. „interfereerende agglutinenen”. Gewoonlijk zijn deze agglutinenen wel zwak, doch bij de uiteindelijke bepalingen over de M of N groep, zouden zij wel degelijk moeilijkheden kunnen opleveren. Deze nevenagglutinenen dienen dus te worden verwijderd. Dit geschiedt door de reeds genoemde adsorptiemethode, m.a.w. *het ruwe anti-M serum zal gereinigd moeten worden*, door het z.g. wasschen met verschillende soorten roode bloedlichamen, een mengsel dus, dat naast het agglutinogeen N, nog de agglutinogenen A, B en O bevat. Hiervoor wordt dan meestentijds een mengsel van bloedlichaampjes genomen van de typen NA, NB en NO. In 't bijzonder zouden wij er den nadruk op willen leggen, dat men vooral zorg draagt het anti-A agglutinine te verwijderen daar dit de meeste moeilijkheden geeft.

In den aanvang toch, toen wij aan deze interfereerende agglutinenen nog geen voldoende aandacht hadden geschonken, heeft dit agglutinine ons tot tweemaal toe in moeilijkheden gebracht. Over de gedetailleerde werkwijze bij dit wasschen verwijzen wij weer naar de uitvoering der serumbereiding.

Laten zich de beide testvloeistoffen anti-M en anti-N even gemakkelijk door adsorptie verkrijgen? Dit blijkt niet het geval te zijn. De algemeene meening is wel, dat het eenvoudiger is het anti-M serum te bevrijden van de nevenagglutinenen, met behoud van een goede titer, dan de anti-N sera. Dit verschil wordt veroorzaakt door de eigenschap van het anti-N agglutinine, om zich veel gemakkelijker, dan dit met het anti-M agglutinine het geval is, aspecifiek te binden. Bij de wassing van het anti-N serum gaat derhalve veel van het anti-N agglutinine verloren, doordat het aspecifiek wordt medegesleept. De wassing van het anti-N serum stelt dan ook hogere eischen dan die van anti-M serum. Aangezien bij 37°, dus bij hogere temperatuur, de neiging tot binding der agglutinenen aan de roode bloedlichamen kleiner is, raden Landsteiner (5), Levine (5) en ook Akune (7) en Wiener (11) aan, de wassing der N sera bij 37° te doen plaats vinden. Bij deze temperatuur zou de aspecifieke binding van het anti-N agglutinine geringer zijn, zoodat een hoogwaardiger eindproduct kan worden bereikt. Toch voelen sommige onderzoekers o.a. Günther en Blaurock (12) wel bezwaren tegen deze werkwijze. De laatste merkt n.l. op, dat bij de uitvoering der adsorptie bij 37° slechts die hoeveelheid nevenagglutinenen

weggenomen worden, die bij die temperatuur werkzaam zijn. Het is wel bekend, dat juist bij deze agglutininen, fracties onderscheiden kunnen worden, die bij bepaalde temperatuur werkzaam zijn. Zonder hierover nu in details te treden, zal het wel duidelijk zijn, waarom deze onderzoekers de adsorptie gedeeltelijk bij 37° en gedeeltelijk, zij het dan ook kort, bij kamertemperatuur laten verlopen. Thomson (9) en ook Posthumus (4) zien van deze adsorptie bij 37° van de anti-N sera geheel af, zij verrichten dus de wassching, zoowel van het anti-M als van het anti-N serum bij kamertemperatuur. Waarschijnlijk is het hun mogelijk, omdat de anti-N waarde van hun sera van een dergelijk hooge titer is, dat deze het bezwaar van de aspecifieke adsorptie toch kunnen verdragen en een anti-N vloeistof overhouden van een voldoende sterkte. Bovendien verricht Posthumus zijn adsorptie bij tropentemperatuur, wat derhalve als een gunstigen factor is te beschouwen.

Daar de anti-M sera bij kamertemperatuur gewasschen worden en de anti-N sera meestentijds bij 37° , treedt hier nog een tweede verschijnsel op. De anti-M sera laten zich gemakkelijker van hun nevenagglutininen bevrijden dan de anti-N sera. Kan men bij een anti-M serum gewoonlijk volstaan met één of tweemaal wasschen, de anti-N sera behoeven meestal een drietot viermalige wassching. Uit den aard der zaak wordt dit verschijnsel veroorzaakt door de geringere bindingsneiging tusschen agglutinine en agglutinogeen bij hooge temperatuur. Overigens wijzen Landsteiner en Levine (10) er met nadruk op, dat de resultaten bij de reiniging zeer verschillend kunnen zijn. Bij sommige sera ondervindt men nagenoeg geen moeilijkheden, terwijl andere sera weer meer zorg eischen wil men een nog voldoende werkzame testvloeistof over houden. Ook bij deze wisselvalligheid der resultaten, zouden wij op willen merken, dat en de sera en de voor het wasschen gebruikte roode bloedlichamen wel hun invloed zullen uitoefenen.

Zijn deze sera en testvloeistoffen lang houdbaar? Algemeen vindt men opgegeven, dat de z.g. ongereinigde sera, mits bewaard bij lage temperatuur en in het donker, zeer lang goed blijven, wanneer er althans geen conserveermiddel aan is toegevoegd. De toevoeging daarvan, o.a. van een $\frac{1}{2}\%$ carbol zou niet gunstig zijn voor den duur der werkzaamheid dezer sera.

Voor de sera zonder conserveermiddel geeft Schiff (11) een geldigheidsduur van 4 jaar op.

Minder gunstig zijn de gegevens voor de testvloeistoffen, hoewel de beoordeeling beter is geworden, dan in den aanvang, toen men meende, dat men deze vloeistoffen slechts één week kon gebruiken. Landsteiner (11) gaf later aan, dat mits men de testvloeistoffen bewaarde bij lage temperatuur in het donker en onder toevoeging van een druppel toluol per c.c. testvloeistof, men deze nog 3 tot 4 maanden lang kon gebruiken. Wiener's (11) oordeel bleek ten slotte nog gunstiger, daar hij, onder dezelfde voorwaarden bewaard als Landsteiner, zijn sera nog voldoende werkzaam vond na zes maanden en zelfs na een jaar.

Ten slotte meenen wij dit literatuuroverzicht niet te mogen besluiten, alvorens wij nog melding gemaakt hebben van wat Landsteiner (10) en Johanna Püschel (13) over de toepassing dezer M en N bepalingen in de praktijk geschreven hebben.

Landsteiner merkt dan op: „It must be emphasized however, that great caution should be employed in the performance and in the interpretation of the tests, particularly those for the property N and that there are questions, concerning the technic of these tests, which still require through study in order to exclude possible mistakes”.

terwijl Johanna Püschel zich als volgt uit: „Die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit ist in jedem Falle einwandfrei möglich, aber schwierig und nur in die Hand geübter und serologisch erfahrener Untersucher gehört”.

Men ziet hieruit, dat de bepaling dezer M en N groepen niet op één lijn gesteld wordt met de bekende bepalingen der O, A, B en AB groepen.

Samenvattend mogen wij dus besluiten, met de opmerking, dat noch het bereiden der sera, noch de uitvoering der M en N reacties geacht worden thuis te behooren in de handen van ongeoefenden. De moeilijkheden bij de bereiding der testsera, de reiniging van deze voor de vervaardiging der testvloeistoffen, maken, dat deze bewerkingen moeten geschieden door den seroloog, terwijl de bepalingen der groepen met behulp der testvloeistoffen zeker minstens alleen mogen worden verricht door personen, die zich een groote ervaring op dit gebied hebben eigen gemaakt.

Wij zullen nu overgaan tot de bespreking der bereiding der anti-M en anti-N sera en testvloeistoffen, zooals deze dan ten slotte door ons werd uitgevoerd. Onnoodig te zeggen, dat hierbij door ons alle maatregelen genomen werden, om een steriele bewerking in alle onderdeelen te waarborgen.

Allereerst moesten wij over bloedlichamen beschikken, waarvan wij met zekerheid konden aannemen, dat ze of tot de groep M of tot de groep N behoorden. Om elke vergissing buiten te sluiten, verzochten wij aan meerdere personen toezending van testvloeistoffen M en N. Wij mochten zoo gelukkig zijn hiervan een drietal zendingen te ontvangen. Door tusschenkomst van Dr. van Dijk in Rotterdam ontvingen wij de testvloeistoffen van Landsteiner, verder stuurde Moureau uit Luik de door hem bereide testvloeistoffen, terwijl op verzoek van Prof. Aldershoff ook Prof. Laubenheimer zoo vriendelijk was, ons zoowel test-sera als testvloeistoffen toe te zenden. Wij grijpen hier gaarne de gelegenheid aan, voor deze bereidwilligheid onzen hartelijken dank te betuigen.

Nu was het voor ons mogelijk geworden alle medewerkers aan ons laboratorium op de eigenschap M en N te testen en daar ons reeds de groepeerdeeling O, A, B en AB bekend was, hadden wij vele personen met verschillende combinaties dezer beide agglutinogenenparen. De mogelijkheid om ons werk met de drie verschillende testvloeistoffen te kunnen controleeren, gaf ons de zekerheid, dat nu elke vergissing was buiten gesloten.

Bij deze oriënteerende onderzoeken bleek ons reeds, dat de testvloeistoffen aanzienlijk langer werkzaam waren, dan aanvankelijk werd opgegeven. Zoo gaf de testvloeistof van Moureau, die wij door onvoorziene omstandigheden 4 maanden hadden moeten laten liggen, voor wij tot het gebruik ervan konden overgaan, nog duidelijke reactie.

Onder de „geteste” personen vonden wij een tweetal, één met de bloedgroep MO en de ander met de groep NO, die zich bereid verklaarden bloed af te staan, voor de immunisatie der konijnen.

Zoowel voor het M-, als het N-serum, werden door ons een tiental konijnen genomen. Het gewicht van deze dieren was gemiddeld 2500 gram. Voor de immunisatie volgden wij, zooals reeds in de inleiding werd opgemerkt, het schema van Wiener (11). Hierbij kregen de dieren drie reeksen van behandelingen.

De eerste reeks bestond uit 10 intraveneuse injecties van 2 c.c. van een nader te bespreken roode bloedlichaampjes suspensie. Na deze eerste reeks volgde een rustperiode van een tiental dagen, waarna een tweede reeks van 9 injecties volgde. De eerste dezer injecties werd intraperitoneaal gegeven, terwijl de 8 volgende injecties weder intraveneus werden toegediend. Na weder een week rust, volgde dan de laatste reeks van 8 injecties, waarvan de eerste intraperitoneaal, de volgende intraveneus werden gegeven. In elke reeks werd zooveel mogelijk elken dag een injectie gegeven, doch soms moest hiervan worden afgeweken. De dieren werden n.l. gedurende de behandelingsperiode nauwkeurig gevolgd wat betreft hun *gewicht* en hun *temperatuur*; aan de hand van de hierdoor verkregen gegevens, werden de injecties geregeld. Het verloop van de behandeling was dan als volgt:

Eerste kuur: intraveneuse injecties van 2 c.c. op 31 Jan., 2 Febr., 4, 5, 6, 7, 8, 9, en 11 Februari.

Tweede kuur: eerste injectie intraperitoneaal, verdere injecties intraveneus: 21, 23, 25, 26, 27 28 Febr. en 1 en 2 Maart.

Derde kuur: eerste injectie intraperitoneaal, verdere injecties intraveneus: 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 Maart.

Ontbloeden: 23 Maart.

In het algemeen konden wij opmerken, dat de dieren weinig op de behandeling reageerden, belangrijke gewichtsschommelingen kwamen niet voor, aan het einde der behandeling bleken nagenoeg alle dieren in gewicht te zijn toegenomen. In de reeks konijnen, die met de MO bloedlichaampjes werden behandeld, traden twee uitvallers op. De dieren stierven door intercurrente oorzaken. Van anaphylactische verschijnselen werd door ons niets waargenomen.

Voor de vrijwillige bloedgevers konden wij de lasten gelukkig tot een minimum beperken. Voor elke kuur bij de konijnen behoefden zij slechts 30 c.c. bloed af te staan, in het geheel dus 90 c.c. in drie tempi. De hoeveelheid van 30 c.c. bloed werd opgevangen in 50 c.c. glucoseoplossing van 5,4% en 20 c.c. 3,8% natriumcitraatoplossing. Aangezien deze oplossing, de z.g. oplossing van „Rous en Turner”, waarschijnlijk door het glucosegehalte zeer gevoelig is voor infectie, moet de bloedafname steriel geschieden. Overigens levert deze oplossing groote voordeelen op, n.l. de bloedlichaampjes blijven er zeer lang onbe-

schadigd in en behouden hun oorspronkelijke kleur. (In physiologische zoutoplossing bewaard worden ze zeer snel paars). De antigene eigenschappen hebben bovendien in de genoemde oplossing slechts weinig te lijden, blijkens het behoud van hun gevoeligheid voor de agglutineerende sera. Na 14 dagen toch bleken deze roode bloedlichaampjes nagenoeg nog een onverminderde reactiemogelijkheid voor deze sera te bezitten. Veel langer echter kon men de bloedlichaampjes niet meer gebruiken, omdat dan een eigenaardig verschijnsel optrad. Schijnbaar zijn dan de roode bloedlichamen intact, d.w.z. wanneer men de vloeistof in de ijskast ziet staan, dan merkt men op, een roode onderlaag, bestaande uit de roode bloedlichaampjes, waarboven zich een volkomen kleurloze vloeistof bevindt. Nauwelijks brengt men echter het fleschje in beweging of direct treedt een sterke haemolyse op. Dit eigenaardige verschijnsel was ons onbekend en wij vonden het nergens beschreven. Op het eerste bloedtransfusiecongres te Rome echter, besprak Prof. Hesse uit Leningrad een dergelijk verschijnsel bij de conserveering van bloed voor transfusie. Na een 10 tot 14 dagen kon dan deze plotselinge haemolyse bij licht schudden optreden, welk verschijnsel hij betitelde met den naam van *latente haemolyse*. Dergelijk bloed is dus voor een transfusie funest, doch evenmin kunnen wij dergelijk bloed voor onze immunisatie-proeven gebruiken.

Van deze bloedlichaampjes suspensie wordt nu op elken injectiedag der konijnen 10 c.c. afgenomen, de roode bloedlichaampjes zorgvuldig gewasschen met physiologische zout-solutie. Ten slotte worden deze goed gewasschen roode bloedlichaampjes gesuspenderd in 20 c.c. zoutsolutie en hiervan wordt dan elk der konijnen 2 c.c. toegediend.

Ongeveer een week na de laatste injectie werden de konijnen verbloed. Het bloed, dat in glazen cylindrs was opgevangen, bleef een dag bij kamertemperatuur staan. Daarna werd het 24 uur in de ijskast geplaatst, waarna het serum kon worden afgeheveld. Het serum van elk konijn werd afzonderlijk bewerkt. Deze bewerking bestond aanvankelijk hierin, dat een deel zonder conserveermiddel in ampullen van 3 c.c. werd gebracht, terwijl het restant met $\frac{1}{2}\%$ carbol in fleschjes werd bewaard. Mocht later toch blijken, dat het bewaren zonder conserveermiddel moeilijkheden had opgeleverd, dan zouden wij

toch nog de beschikking hebben over carbolserum. Tevens kregen wij de gelegenheid om den invloed van $\frac{1}{2}\%$ carbol op deze sera te bestudeeren. Voor zoover wij nu uit eenige vergelijkingen kunnen opmaken, is de invloed van de carbol na $\frac{3}{4}$ jaar nog niet sterk uitgesproken. Overigens is dit materiaal nog te gering om hieruit ook maar eenige zekere conclusie te mogen trekken.

Zooals ons reeds bekend is, moeten de verkregen konijnen-sera gereinigd worden van de nevenagglutinenen. Allereerst werden de sera geïnactiveerd ($\frac{1}{2}$ uur bij 56°), waarna zij voor de wassching eerst werden verdund. De verdunningsgraad lieten wij wisselen van 1 op 15 tot 1 op 25, al naar gelang de ervaring ons op den duur leerde bij welke verdunning bij een bepaald serum de beste uitkomsten werden verkregen. Hierna werden aan het verdunde serum de waschbloedlichaampjes toegevoegd, die natuurlijk slechts die agglutinogenen voor de agglutinenen bezaten, welke wij wenschten te doen adsorbeeren. De hoeveelheid waschroodebloedlichaampjes, waarvoor het centrifugaat van een drie- tot vier maal gewasschen hoeveelheid bloed werd gebezigd, bedroeg ongeveer de helft van de massa van het verdunde serum.

Om dit waschbloed te verkrijgen, moesten wij weer een beroep doen op de vrijwillige gevers en nu in heel wat zwaardere mate dan voor het immuniseeren der konijnen. Bovendien waren nu heel wat meer gevers noodig, daar wij toch zooveel mogelijk met verschillende agglutinoëencombinaties wilden wasschen (zie pag. 4). Deze behoefte, om verschillende soorten roode bloedlichaampjes te gebruiken, trad vooral sterk naar voren, toen wij tweemaal moeilijkheden hadden gehad met de in de testvloeistof achtergebleven anti-A agglutinine, zooals wij reeds in de inleiding opmerkten. Het feit, dat wij steeds verschillende gevers moesten lastig vallen, remde onze werkzaamheden wel sterk. Niet, dat men ons niet gaarne behulpzaam wilden zijn ¹⁾, doch toen wij eenmaal eenige testvloeistoffen met een goeden titer verkregen hadden, wilden wij hen, alleen om onze nieuwsgierigheid te bevredigen, over de waarde der andere sera, niet

¹⁾ Wij grijpen hier gaarne de gelegenheid aan, om allen, die zich als gever beschikbaar hebben gesteld, waarbij wij in 't bijzonder Mej. Pel, Dr. Reith en Dr. Tasman zouden willen noemen, onzen hartelijken dank voor hun medewerking, te betuigen.

lastig vallen. Gelukkig zijn wij voor goed uit dit dilemma geraakt. Het is n.l. gebleken, waarop Crome (6) heeft gewezen, dat men voor deze wassching gebruik kan maken van de bloedlichamen uit de bloedkoeken van de bloedmonsters, die voor onderzoek op Wassermann worden ingezonden. Deze roode bloedlichamen zouden zelfs uiterst geschikt zijn om konijnen te immuniseeren. Toen wij eenmaal deze werkwijze tot verkrijging van waschroodebloedlichaampjes hadden uitgewerkt, konden de onderzoekingen verder ononderbroken worden voortgezet.

Na deze uitweiding keeren wij terug tot de wassching der sera. Het verdunde testserum werd eenigen tijd met de waschbloedlichamen in contact gelaten, voor de anti-M sera bij kamertemperatuur, voor de anti-N sera bij 37° . De duur van dit contact hebben wij eenige malen gewijzigd, aanvankelijk bedroeg het 2 uur, in navolging van Landsteiner (5), die opgaf 2 uur bij kamertemperatuur of 1 uur in de stoof. Later hebben wij zonder bezwaar dezen tijd tot 10 minuten kunnen terugbrengen. Een langer contact, zooals door Landsteiner en anderen wordt opgegeven, bleek ons geen betere resultaten op te leveren, waarin wij met Posthumus (4) overeenstemmen. Bij het anti-N serum meenden wij zelfs van een langer contact nadeelen te ondervinden, omdat het anti-N agglutinine nog meer aspecifiek werd gebonden.

Tot het verrichten van de adsorptie der anti-N sera bij kamertemperatuur, waarmede Thomson en ook Posthumus meenen te kunnen volstaan, zijn wij niet overgegaan, aangezien wij opmerkten, dat onze resultaten, zij het dan ook niet zeer uitgesproken, toch minder gunstig werden. Van de methode van Blaurock om de adsorptie eerst bij 37° en daarna bij kamertemperatuur te verrichten, hebben wij in verband met de korte contactperiode van 10 min. afgezien. Hiervan hebben wij geen bezwaren ondervonden, wat wij toeschrijven aan het feit, dat tusschen de periode bij 37° en het centrifugeeren steeds eenige minuten verliepen, met tarreeren enz. en dat die periode voldoende was, om de nog overgebleven agglutininen te binden, helaas wellicht ook om de aspecifieke N binding toch nog gedeeltelijk tot stand te doen komen. Wellicht is deze binding iets langzamer dan de normale binding, waardoor onze resultaten, in vergelijking met die van Wiener, die uitsluitend bij 37° werkt,

slechts een weinig geringer zijn. Overigens namen wij, evenals in de inleiding werd medegedeeld, het verschijnsel waar, dat de anti-M sera zich gemakkelijker lieten reinigen, dan de anti-N sera, waarvoor wij als voorbeeld een tweetal tabellen laten volgen. Hieruit blijkt, dat het anti-N serum eerst na drie waschingen aan de te stellen eisch van specificiteit voldoet, het anti-M serum daarentegen maar twee nodig heeft, althans voor zoover het betreft het anti-M of anti-N agglutininie.

TABEL I.
Reiniging van het anti-M serum No. 288 A II.

Immuun-serum 15 × verdund	Test roode bl. lich.	Verduunningen								
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Vóór de adsorptie	M	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—
	N	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Na de 1e behandel- ing met 1/2 vol. N r. bloedlich.	M	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
	N	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Na de 2e behandel- ing met 1/3 vol. N r. bloedlich.	M	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABEL II.
Reiniging van het anti-N serum No. 302 A III.

Immuun-serum 25 × verdund	Test roode bl. lich.	Verduunningen								
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Vóór de adsorptie	M	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
	N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Na de 1e behandel- ing met 1/2 vol. M r. bloedlich.	M	++	++	+	+	+	+	+	—	—
	N	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—	—
Na de 2e behandel- ing met 1/2 vol. M r. bloedlich.	M	++	+	+	—	—	—	—	—	—
	N	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
Na de 3e behandel- ing met 1/2 vol. M r. bloedlich.	M	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N	+++	+++	++	—	—	—	—	—	—

Overigens was de aspecifieke adsorptie der anti N agglutinenen bij verschillende sera zeer uiteenlopend.

In enkele gevallen was deze zeer gering, in andere daaren-

tegen weer zoo sterk, dat een oorspronkelijk hoogwaardig anti-N serum na eenige wasschingen zoodanig in titer was ingezonken, dat het onbruikbaar was. Hierbij bleek weer, dat dit niet alleen afhankelijk was van de eigenschappen van het bepaalde serum, maar ook van de eigenschappen der gebruikte roode bloedlichamen, die voor de wassching gebruikt waren.

De bepaling der werkzaamheid der verkregen vloeistoffen na de wasschingen, werd door ons, evenals bij de verdere titerbepalingen, meestentijds op twee wijzen verricht, n.l. de voorwerpglasmethode en de buisjesmethode. Bij de voorwerpglasmethode werd op een voorwerpglas een druppel van de testvloeistofverdunding met een druppel van een pl.m. 2% suspensie van de betreffende roode bloedlichamen (hier dus M of N roode bloedlichamen) tezamen gebracht. Op grond van de o.i. juiste opmerking van Wiener (11), dat de grootte van het oppervlak, dat men deze gezamenlijke druppels geeft, een rol speelt bij de agglutinatie, althans voor de snelheid van optreden er van, werden alle druppels tot ongeveer dezelfde grootte uitgewreven. Het glaasje werd daarna krachtig heen en weer geschommeld, waardoor in den druppel een voortdurende vloeistofstrooming ontstaat, zoodat het contact tusschen agglutinine en agglutino-gen zoo groot mogelijk wordt gemaakt. De uiteindelijke aflezing geschiedde macroscopisch bij doorlichting van den druppel met behulp van een met matglas afgedekt electrisch lampje; enkele malen slechts werd een loupe en nog zeldzamer een microscoop te hulp geroepen. Het aflezen dezer agglutinaties levert, nadat men er voldoende ervaring over heeft opgedaan, slechts zelden moeilijkheden op. Naast deze voorwerpglasmethode voerden wij ook de buisjesmethode uit, zooals deze door Wiener (11) beschreven wordt. In een buisje, met een inwendigen diameter van 8 mm., brachten wij 1 druppel van de bovengenoemde te onderzoeken vloeistof + 2 druppels physiol. zoutsolutie + 1 druppel 1—2% bloedsuspensie. Na 5 min. bij kamertemperatuur gestaan te hebben, werd 3 min. gecentrifugeerd op 2000 toeren. Voor het aflezen der eventueele agglutinatie werd de inhoud van het buisje opgeschud; bij een positieve reactie bleef het roode bloedcellen-conglomeraat onveranderd (+++) of viel uiteen in een aantal grootere (++) of kleinere (+) brokjes, de vloeistof bleef echter helder. Was geen agglutinatie opgetreden, dan viel het roode bloedklompje geheel uit elkaar en ontstond er een roode

troebele suspensie. Tot op heden vinden wij de voorwerpglas-methode iets gevoeliger dan de buisjesmethode, toch wordt de laatste nog altijd als controle naast de eerste gebruikt, daar in de literatuur juist aan de buisjesmethode de meeste waarde wordt toegekend. Daar het aantal vergelijkende bepalingen nog onvoldoende is, durven wij voorloopig nog geen beslist oordeel uit te spreken, zooals wij dat bij de gewone bloedgroepbepalingen op het Congres in Rome hebben gedaan, waarbij wij op grond van een 1000 tal nauwkeurig uitgevoerde vergelijkende onderzoeken aan de voorwerpglasmethode de voorkeur hebben kunnen geven.

Wat nu betreft de resultaten, welke wij met de immuniseering der konijnen hebben bereikt laten wij in tabel III volgen.

TABEL III.

Nummer van het serum	Aard van het serum	Aggl. met r. bloedlich. verdund 1 : 25		Eindtiter van de vloeistof		
		I MO	II NO	t.o.v. M beginverd 1 : 15	t.o.v. N beginverd. 1 : 25	
283	M	800	3200	64	—	
284	"	1600	3200	16	—	
285	"	6400	6400	16	—	
286	"	1600	1600	2	—	
287	"	3200	3200	32	—	
288	"	6400	3200	32	—	
289	"	1600	3200	32	—	
290	"	3200	1600	64	—	
291	"	1600	3200	2	—	
292	"	3200	6400	16	—	
						1 : 15
293	N	3200	12800	—	16	27
294	"	1600	3200	—	4	7
295	"	1600	1600	—	8	13
296	"	1600	1600	—	8	13
297	"	1600	1600	—	16	27
299	"	400	1600	—	8	13
300	"	1600	3200	—	4	7
301	"	400	3200	—	8	13
302	"	3200	12800	—	8	13

In deze tabel hebben wij in de kolommen 3 en 4 opgegeven, het getal, dat aangeeft hoeveel maal men het oorspronkelijke serum kan verdunnen, om nog juist een agglutinine van men-

schelijke roode bloedlichamen (No. I en II) te zien optreden. Wiener (11) geeft op, dat hierbij op zijn minst waarden van 2000—3000 moeten gevonden worden. Onze uitkomsten zijn dus betrekkelijk gunstig te noemen. Vervolgens geven wij de titers van de testvloeistoffen M en N. Vergelijkt men deze getallen met Wiener (11), dan zijn onze uitkomsten wel iets lager, doch daarbij verlieze men niet uit het oog, dat onze verdunningen van de oorspronkelijke sera, voor het wasschingsproces grooter genomen zijn, aangezien wij meenden op te merken, dan minder agglutinine door aspecifieke bindingen te verliezen. Beschouwen wij deze tabel nog eens, dan zijn er een tweetal punten, die in de eerste plaats onze aandacht vragen. Als een geheel onverwacht verschijnsel bemerken wij, dat de sera, die met MO roode bloedlichamen zijn bereid, toch tegen MO roode bloedlichamen (n.l. roode bloedl. No. I) een gemiddeld lageren titer vertoonen, dan die in de volgende kolom met de NO roode bloedlichamen (n.l. r. bl. No. II). Bij de sera bereid met NO roode bloedlichamen, in de 2e serie dus, komt dit verschijnsel niet te voorschijn, al hoewel wij toch hogere titers hadden verwacht met NO roode bloedlichamen. Hoe kan men dit verschijnsel verklaren? De interfereerende agglutinenen kunnen wij wel buiten beschouwing laten, aangezien deze in het algemeen gering zijn, zoodat wij naar een andere oorzaak moeten zoeken. En deze meenen wij gevonden te hebben in het agglutinogeen O, waar wij reeds over hebben geschreven. In beide gevallen toch zal hiertegenover een agglutinine zich kunnen vormen, waardoor de eindtiter dus niet alleen afhankelijk is van de hoedanigheid van het M of N agglutinogeen, doch tevens van de immuniseerende eigenschappen van het O agglutinogeen. De gevormde titer-waarden zijn bovendien nog afhankelijk van de gevoeligheid der gebruikte M of N agglutinogenen. Men kan dus uit deze waarnemingen niet besluiten of konijnen op M of N agglutinogenen meer of minder goed reageeren, daar toch steeds de bijfactor, in dit geval O, een rol zal spelen en deze bijfactor nimmer is weg te nemen. Wij meenen daarom in het vraagstuk, waarin Landsteiner en Thomson tegenover elkaar staan, n.l. of een konijn in het algemeen beter op M of N agglutinogeen reageert, geen standpunt te kunnen innemen.

Het tweede punt waarop wij willen wijzen zijn de titers, die uiteindelijk in de verschillende testvloeistoffen zijn bereikt. Wanneer wij, om de titerwaarden der anti-M vloeistoffen met

die der anti-N vloeistoffen te kunnen vergelijken, de beginverduunning, waarvan wij uitgingen, gelijk nemen, n.l. $\frac{1}{16}$, dan zien wij dat, afgezien van de beide uitvallers n.l., No. 286 en 291 van M en No. 294 en 300 van N, de gemiddelde titer van M = 34 en van N = 17 is. Volgt hier nu uit, dat de productie van het anti-M agglutinine beter is dan van het anti-N agglutinine? In genen deele, want zooals wij reeds zagen, bij de reiniging speelt hier de wijze van bewerking een groote rol.

Verder bleek ons in de praktijk, dat sera met titer 8, zooals No. 295, 296, 299, 301 en 302, nog zeer bruikbaar waren voor de bepaling der bloedgroepen. Oogenschiijnlijk wijkt deze waarde eenigszins af van die van Wiener, die een titerhoogte van 10 aangeeft, doch hierbij merken wij op, dat deze getallenwaarde van de titers slechts van zeer betrekkelijke beteekenis is. Een standaardmaat heeft men voor deze titreeringen nog niet vastgelegd, zoodat elke titreering van een testvloeistof ook afhankelijk is van de gevoeligheid der roode bloedlichamen of liever van de daaraan verbonden agglutinogenen, die voor deze bepalingen gebruikt zijn. Het getal dat dus de titerwaarde van een testvloeistof uitdrukt, zal tevens van de genoemde gevoeligheid afhangen. Is deze groot, dan stijgt de titerwaarde, is deze klein, dan daalt dit getal.

Dit komt wel zeer goed tot uiting in de tabellen IVa en IVb. In deze tabel worden opgegeven de verschillende titerwaarden van verschillende testvloeistoffen op verschillende tijden. En nu kan men bij de testvloeistof 288 BII waarnemen, dat de titer is toegenomen na een periode van 5 maanden. Onnoodig te zeggen, dat dit uitsluitend daarop berust, dat in het laatste geval, de roode bloedlichamen gemakkelijker tot agglutinatie waren te brengen, dan bij de voorgaande bepaling.

Uit deze tabel volgt duidelijk, dat de oorspronkelijke opgegeven duur der houdbaarheid der testvloeistoffen, n.l. een week, veel te kort is. Deze vloeistoffen zijn aanzienlijk langer bruikbaar, in onze gevallen toch 6 tot 8 maanden, waarop wij echter opmerken, dat ze daarvoor in het donker bij pl.m. 2° C. en onder toluol moeten bewaard worden. Is dat niet het geval, zooals met de, door Julien medegenomen, testvloeistoffen, die wel in het donker en onder toluol, maar niet bij 2° C. werden bewaard, dan komt men tot geheel andere uitkomsten. Wij hebben n.l. vergeleken, de waarde der door ons bewaarde testvloei-

TABEL IVa.

Testvloeistof N	Datum van wasschen	Begin­titer verd. 1:25	Titer op 9. 5. '35	Titer op 24. 6. '35	Titer op 11. 9. '35	Titer op 21. 11. '35
293 A II	1. 5. '35	16	16	—	—	—
293 B II	2. 5. '35	16	16	8	8	—
294 A I	20. 11. '35	4	—	—	—	4
295 A I	20. 11. '35	8	—	—	—	8
296 A I	20. 11. '35	8	—	—	—	8
297 A IV	15. 4. '35	16	8	8	—	—
297 D IV	15. 4. '35	16	8	8	—	—
297 H IV	25. 4. '35	32	16	—	—	—
297 K III	25. 4. '35	32	32	8	—	—
297 L III	25. 4. '35	32	32	8	8	8
297 O III	1. 11. '35	16	—	—	—	8
297 P III	1. 5. '35	16	16	—	—	—
300 A I	20. 11. '35	4	—	—	—	4
301 A I	20. 11. '35	8	—	—	—	8
302 A III	18. 7. '35	8	—	—	8	8

TABEL IVb.

Testvloeistof M	Datum van wasschen	Begin­titer verd. 1:15	Titer op 9. 5. '35	Titer op 24. 6. '35	Titer op 11. 9. '35	Titer op 21. 11. '35
283 A I	5. 6. '35	64	—	16	16	16
283 B I	28. 6. '35	32	—	—	16	16
284 I	25. 4. '35	16	16	—	—	—
284 A II	28. 4. '35	16	16	—	—	—
284 B II	1. 5. '35	16	16	8	8	—
285 II	25. 4. '35	16	8	—	—	—
285 B II	28. 6. '35	16	—	—	16	16
286 A I	6. 5. '35	2	2	—	—	—
287 A I	17. 6. '35	32	—	16	16	16
287 B I	17. 6. '35	32	—	8	8	16
288 A II	3. 5. '35	64	64	32	—	—
288 B II	6. 5. '35	32	32	16	32	32
288 C II	1. 11. '35	32	—	—	—	32
289 A II	6. 5. '35	32	32	32	—	—
290 A I	6. 5. '35	128	128	16	—	—
290 B II	7. 5. '35	64	64	32	—	—
291 A I	6. 5. '35	2	2	—	—	—
292 A III	6. 5. '35	16	16	16	16	16

stoffen en die van dezelfde vloeistoffen, die met Julien waren mede geweest; toen bleek ons, dat de door ons bewaarde nog

volkomen onveranderd, die van Julien echter waardeloos waren geworden.

Gelukkig kunnen wij nog mededeelen, dat de door Julien gebruikte testvloeistoffen tot den laatsten dag van zijn onderzoek werkzaam waren gebleven, alhoewel de anti-N vloeistof tamelijk sterk in activiteit was achteruit gegaan. Hij deelde ons mede, dat hij zeer tevreden was, over de met deze vloeistoffen bereikte resultaten en dat hij te gelegener tijd hier zelf op zal terugkomen.

Om onze testvloeistoffen aan de praktijk te toetsen, hebben wij er een 600-tal onderzoekingen mede verricht op bloedmonsters, die ons toevallig in handen kwamen, gedeeltelijk afkomstig van adspirant-gevers van bloedtransfusiediensten, terwijl een ander deel in ons instituut was binnengekomen voor Wassermann-onderzoek. Deze bloedmonsters waren derhalve afkomstig uit alle deelen van het land en leverden dus geen materiaal van anthropologische waarde op. De bedoeling zat hierbij voor, om niet alleen ervaring met deze vloeistoffen op te doen, maar ook vooral om ons te overtuigen, dat wij geen personen zouden vinden, die noch op onze anti-M, noch op onze anti-N zouden reageeren, dus die uit hoofde van deze agglutinogenen tot de M-N-personen zouden behooren. De tot dusver uit de literatuur bekende onderzoekingen, die de 10000 al gepasseerd zijn, hebben op slechts eenige uitzonderingen na, nimmer M-N-personen opgeleverd. Achteraf bleek, dat juist in deze uitzonderingsgevallen de testvloeistof onvoldoende werkzaam was. Om hiervoor gevrijwaard te blijven, hebben wij deze 600 personen onderzocht, waarvan de verdeeling bleek te zijn M: 27%; N: 22%; MN: 51%; terwijl er geen enkele M-N- onder werd aangetroffen, wat dus zeker voor de waarde onzer vloeistoffen pleit. Ook onder het materiaal van Julien, dat loopt over ruim 1000 waarnemingen, is het ontbreken van de M en N bij den zelfden persoon geen enkele maal voorgekomen.

Bij de bereiding der testvloeistoffen zijn wij op een moeilijkheid gestooten, die ons heel wat hoofdbreken heeft gekost. Het gebeurde n.l. meerdere malen, dat onze eindproducten na de wassching der sera met roode bloedlichamen, soms meer of minder haemolytisch waren geworden. En het vreemde was, dat deze haemolyse dan eens niet, dan eens wel optrad, zonder dat

wij er een bepaalde plausible verklaring voor konden geven. Aanvankelijk dachten wij, dat deze haemolyse zou berusten op het niet voldoende geïnactiveerd zijn van de sera. Wanneer toch een serum reeds enkele weken in de ijskast had gestaan, werd aanvankelijk door ons van inactiveren afgezien. Maar spoedig bleek, dat ook na inactiveren onze bezwaren bleven bestaan. Toen werd aan de toevoeging van carbol bij de sera de schuld gegeven. In den aanvang toch van onze proeven gebruikten wij zooveel mogelijk de carbolsera, die op grond van de literatuuropgaven waarschijnlijk een kortere houdbaarheid zouden bezitten, dan de sera, die geen conserveermiddel bevatte. Maar ook hier bleek weder onze veronderstelling onjuist te zijn. Mogelijk zou dan de lange contactperiode tusschen verdund serum en waschroodebloedlichaampjes n.l. 2 uur bij kamertemperatuur of 1 uur bij 37° de oorzaak kunnen zijn. Verkorting van dezen tijd tot 10 minuten leerde ons wel, dat een langer contact voor de adsorptie niet noodig was, (zie blz. 338) maar het haemolytische bezwaar verdween niet, evenmin als dit geschiedde door den centrifugeertijd te verkorten, of het toerental bij het centrifugeeren te verminderen. Toen wij ten einde raad waren en onze stemming dat peil bereikt had, waarin Crome neerschreef: „Die auf diesen Weisen gereinigten Seren sehen zwar leicht haemolytisch aus, auf Ihre Stärke und Haltbarkeit scheint dieser Umstand ohne nachteiligen Einfluss zu sein,” kwam het toeval ons helpen. Gewoonlijk toch schudden wij voor het centrifugeeren, dus nadat het serum zijn agglutineerende werking op de roode bloedlichamen heeft uitgeoefend, voor alle zekerheid de suspensie nog eens goed dooreen, om het contact tusschen nog eventueel niet gebonden agglutinenen met de roode bloedlichamen zooveel mogelijk te vergrooten. Voor wij schudden, dus na de contactperiode, was de bovenstaande vloeistof helder, na het schudden was natuurlijk de geheele massa homogeen rood, na het centrifugeeren bleek dan de bovenstaande vloeistof haemolytisch te zijn. Door toevallige omstandigheden lieten wij één van onze mengsels, dus verdund serum en roode bloedlichamen, na het schudden buiten de centrifuge staan en nu bleek, dat na het weder uitzakken der roode bloedlichamen, de bovenstaande vloeistof niet meer helder, doch haemolytisch was geworden. *Het schudden was dus nu de oorzaak der haemolyse.*

Dit verschijnsel vertoont ons inziens overeenkomst met de zoogenaamde latente haemolyse van Hesse. Daar zou men de haemolyse toe kunnen schrijven aan het gevoeliger worden der roode bloedlichamen door het tijdsverloop, hier door het geagglutineerd zijn. Bij nadere beschouwing der literatuur viel ons op, dat Johanna Püschel (13) er reeds op wees, dat men deze geagglutineerde roode bloedlichamen alleen, zoo noodig, over kon schenken, terwijl Posthumus (4) het ongewenschte van schudden opmerkte; dit zijn de eenige aanwijzingen, die wij naar aanleiding van dit haemolytisch verschijnsel hebben kunnen vinden.

Beschouwen wij ten slotte de bij deze bereiding der anti-M en anti-N testvloeistoffen opgedane ondervinding, dan springt één zaak wel sterk op den voorgrond, n.l. dat er heel veel factoren bij deze anti-M en anti-N bereiding in het spel zijn, waarvan wij niet of nog slechts heel matig op de hoogte zijn. Zagen wij dit verschillende resultaat al bij de vorige opgave over het gemakkelijkst te bereiden hoogwaardige serum, waar wij Landsteiner en Thomson tegenover elkander vinden, niet minder is ons opgevallen, dat bij het reinigen der testsera en de bereiding der testvloeistoffen eveneens zeer afwisselende resultaten kunnen worden bereikt, waarvan ons de oorzaak vaak nog volledig ontgaat en die wij slechts als „eigenschappen” der testvloeistoffen kunnen betitelen. Wij kunnen dan ook volledig instemmen met Landsteiner, waar hij schrijft:

„It is necessary to become well acquainted with the method and to now the properties of each serum in order to absorb completely all agglutinins but those in question”.

Samenvatting.

Na een overzicht over hetgeen in de literatuur over M en N bekend is, volgt de beschrijving der bereiding van anti-M en anti-N testvloeistoffen. Hierbij onderscheidt men de bereiding van *sera* en die van *testvloeistoffen*.

Verschilpunten met vorige onderzoekers zijn:

1. Geen conclusie omtrent beter vormen van anti-M of anti-N agglutinenen.
2. Invloed van O-agglutinogeen bij de vorming der sera.
3. Voorkomen van haemolyse bij wassching der sera.

Schrijver sluit zich aan bij de opvatting van Landsteiner, dat zoowel de bereiding van testvloeistoffen, als de bepaling van groepen M en N in handen behooren te zijn van een goed onderlegd seroloog, die over een groote ervaring beschikt en bovendien werkzaam is in een goed toegerust laboratorium.

LITERATUUR.

- (1) K. Landsteiner en P. Levine: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1927 24 600—602.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1927 24 941—942.
 - (2) Wolff en Jonsson: Deutsch Zeitsch. f. d. Ges. Gericht. Med. 1933 22 84.
 - (3) Dr. N. Blinor (Leningrad): Münchener Med. Wochenschrift. 1935 48 1904.
 - (4) C. Posthumus: Geneesk. Tijdschr. Ned. Indië 1934 74 II 1416.
 - (5) K. Landsteiner en P. Levine: Journ. Exp. Med. 1928 47 757.
 - (6) W. Crome (Bonn): D. Z. f. d. Ges. Ger. Med. 1932 20 316.
 - (7) M. Akune (Tokio): Z. f. Imm.forsch. und Exp. Ther. 1931 71 147-171.
 - (8) Jadin: C. R. de la Soc. de Biol. 1932 CX 123.
 - (9) Paul Stefan: Handbuch der Blutgruppenkunde, 1932, pag. 35.
 - (10) K. Landsteiner en P. Levine: Journ. of Exp. Med. 1928 48 731.
 - (11) A. Wiener: Bloodgroups and Bloodtransfusion 1934 119.
 - (12) Günter Blaurock (Köln): Münch. Med. Wochenschr. 1932 79 1552—1560.
Z. f. Imm.forsch. und Exp. Ther. 1933 79 337.
 - (13) Johanna Püschel (Danzig): Z. f. Imm.forsch. und Exp. Ther. 1933—1934 bd 81 445.
 - (14) K. Landsteiner: Journ. Am. Med. Ass. 1935 103 1043.
-

Over het gebruik van d-glutaminezuur bij het bacteriologische wateronderzoek

DOOR

W. KAUFFMANN en JAN SMIT.

Een der factoren, die bij het bacteriologische wateronderzoek het snel verkrijgen van een duidelijk sprekend resultaat verhinderen, bestaat in de z.g. „false presumptive test”, waaronder verstaat het uitblijven van groei van *B. coli*, als men door het water in gisting gebrachte suikerhoudende vloeistoffen op voor die bacterie gunstige voedingsbodems overbrengt. Als oorzaak van dit verschijnsel laat men meestal twee mogelijkheden toe:

1e. Andere bacteriën dan *B. coli* waren de oorzaak der gisting.

2e. De eerst vermenigvuldigde *B. coli* is door andere soorten overgroeid en heeft zich daardoor op den vasten voedingsbodem niet kunnen ontwikkelen.

Dat de eerstgenoemde mogelijkheid overweegt is door een onzer (1) in zijn proefschrift nader aangetoond.

Bekend genoeg is, dat men vermindering van deze moeilijkheden vooral gezocht heeft in de toevoeging van allerlei groei-remmende verbindingen, in den hoop, dat wel de groei van deze andere soorten maar niet die van *B. coli* zelf die remming zou ondergaan. Over de uitkomst van al deze pogingen heerscht geen eenstemmig oordeel, zoodat men in officieele voorschriften zich nog veelal aan de oude recepten houdt, ondanks hun gebleken nadeel.

Het leek ons de moeite waard, de oplossing in een andere richting te zoeken, n.l. in die van een vereenvoudiging van de stikstofverbindingen der suikervloeistof, uitgaande van het feit, dat *B. coli* met vrij eenvoudige stikstofverbindingen genoegen

neemt, terwijl dit met de hinderende bacteriën niet het geval pleegt te zijn. In dit opzicht geeft b.v. reeds de vervanging van lactose-bouillon door lactose-peptonwater een duidelijke verbetering.

Het meest voor de hand liggend zou zijn, een ammonium-zout als stikstofvoedsel te gebruiken, waarvan de assimileerbaarheid in suikeroplossingen voor *B. coli* vaststaat. Schaeffer (2) heeft voor de bepaling der gistingsgrenzen een ammoniumphosfaat-suikermEDIUM met een peptonhoudende vloeistof vergeleken en gevonden, dat *B. coli* in het eerste zeer goed groeide en de gisting ook met zijn aanwezigheid parallel ging, maar dat de gisting te langzaam verliep, terwijl tevens de gistingsgrens iets achterbleef bij het lactose-peptonwater.

Nu doet zich bij het gebruik van pepton steeds weer het hinderlijke feit voor, dat de verschillende handelsmerken daarvan verschillend van samenstelling en voedingswaarde zijn, en ook verschillen in de mate, waarin zij de „false presumptive tests” mogelijk maken. Men kan wel de peptonsoort uitzoeken, die in dit opzicht aan den hoogsten eisch voldoet of, zooals Folpmers (3) doet, zelf een peptonoplossing bereiden door vertering van caseïne, maar het euvel blijft, dat men ervan de onveranderlijke samenstelling dezer producten geenszins overtuigd kan zijn, terwijl de juiste samenstelling niet bekend en ook niet reproduceerbaar is, zoodat de behoefte blijft bestaan aan een eenvoudige, chemisch goed gedefinieerde stikstofverbinding, die voor *B. coli* goed geschikt en voor de in aanmerking komende verontreinigende bacteriën onbruikbaar moet zijn, en tegen niet te hoogen prijs en in voldoende hoeveelheid verkrijgbaar is.

Hoewel van te voren niet overtuigd, dat zoo'n stof te vinden zou zijn, hebben wij de reeks van eenvoudige verbindingen de revue laten passeeren, die door den Dooren de Jong (4) zijn onderzocht op hun assimileerbaarheid voor 13 verschillende bacteriesoorten. Vaste conclusies zijn uit dat onderzoek niet af te leiden, daar o.a. de anaërobe sporevormers, voor het water-onderzoek zoo belangrijk, daarbij niet onderzocht zijn.

Onder de in aanmerking komende eenvoudige stikstofverbindingen viel ons oog op het glutaminezuur, dat immers in bouillon voorkomt en gemakkelijk in zuiveren toestand te bereiden is.

De bereiding is als volgt:

1300 gram tarwegluten¹⁾ worden met 1600 c.c. 38% zoutzuur 18 uur aan een opstijgende koeler gekookt. De vloeistof kleurt zich daarbij zeer donker. Na afkoeling wordt het gevormde vaste melanine afgezogen en het zwarte filtraat ingedampt tot het zoutzure zout van het glutaminezuur begint te kristalliseeren. Dit wordt scherp afgezogen, weer opgelost in water en de oplossing wordt met kool ontkleurd. Deze ontkleurde oplossing dampst men opnieuw in en het zoutzure zout wordt weer teruggewonnen en nog eenmaal omgekristalliseerd. Aan het aldus verkregen zout, opgelost in 750 c.c. water, voegt men de berekende hoeveelheid natriumcarbonaat (op 183.5 gr. zout 53 gr. watervrije soda) toe, waardoor het glutaminezuur neerslaat. Dit wordt afgezogen, opnieuw met water aangeroerd, weer afgezogen en gedroogd. Het verkregen glutaminezuur smelt bij 197-198° C. hetgeen overeenkomt met het smeltpunt van het zuivere glutaminezuur. Bovendien werd een mengsmeltpunt bepaald met zuiver glutaminezuur, dat Prof. Bartow te Iowa City zoo vriendelijk was ons te zenden. Ook dit lag bij 197-198° C. De $[\alpha]_D$ bij 21° C. van het glutaminezuur in zoutzuur (1 mol HCl op 1 mol glutaminezuur) bedroeg 30.5° C. De opbrengst was 160 gram²⁾.

Het medium dat wij gebruikten werd nu als volgt samengesteld:

Aan een oplossing van 10 gram glutaminezuur + 10 gr. lactose + 1 gr. K_2HPO_4 + 200 mgr. $MgSO_4$ in iets minder dan 1 L. aqua dest. voegt men 1 c.c. van een 0.5% alcoholische broomthymolblauwoplossing toe, neutraliseert vervolgens nauwkeurig met 25% NaOH tot de kleur diepgroen is (pH 7.0—7.1) en vult aan tot 1 L.

Aan de deugdelijkheid van deze vloeistof als medium voor de „presumptive test” stelden wij de volgende eischen:

¹⁾ Voor de verstrekking van een monster tarwegluten zijn wij de firma Honig's Fabrieken te Koog a/d Zaan ten zeerste verplicht.

²⁾ Het d-glutaminezuur wordt door verschillende firma's geleverd. Ons bekend is de prijs van het door de firma Schuchardt te Görlitz geleverde zuivere preparaat: 16 gulden per K.G. Bovendien brengt de firma S. Suzuki te Tokio een preparaat van het mononatriumzout in den handel, dat in Japan als specerij dienst doet en den naam draagt van Aji-no-moto. Prijsopgaaf hebben wij tot nu toe niet ontvangen.

1e. Moeten de vertegenwoordigers van de coligroep er goed in kunnen groeien onder zuur- en gasvorming.

2e. Moeten de gistingsgrenzen minstens evenver gaan als bij gebruik van lactose-bouillon of lactose-peptonwater.

3e. Moet uit de gistende vloeistof *B. coli* geïsoleerd kunnen worden.

Ten einde nu na te gaan of het hiervóór opgegeven lactose-natriumglutaminaat-medium aan de door ons gestelde eischen voldeed, deden wij verschillende proeven.

Allereerst wat het groeien van vertegenwoordigers van de coligroep betreft. Hiertoe werden 48 reïncultures, waaronder 16 stammen van *B. coli commune*, 16 van de „intermediaire” groep en 16 stammen van *A. aerogenes* in dit medium geënt en bij 37° C. bebroed. Na 24 uur vertoonden 46 stammen gasvorming, terwijl 1 stam van *B. coli commune* en 1 stam van *A. aerogenes* een negatief resultaat opleverden. Deze beiden vertoonden echter ook in lactose-peptonwater een afwijkend gedrag. Zij waren hierin eerst na 48 uur positief, terwijl de overigen reeds na 24 uur gistten. Hieruit blijkt duidelijk, dat deze organismen uit de coligroep in het nieuwe medium groeien, zonder belangrijk afwijkende resultaten in vergelijking met lactose-peptonwater.

Ook de gistingsgrenzen met verschillende watermonsters gingen wij na. Wij vergeleken voor zeven watermonsters van verschillende herkomst de gistingsgrenzen in dit lactose-natriumglutaminaat-medium met die in glucose- en lactose-peptonwater zoowel bij 37° als bij 45° C.

De uitkomsten zijn in onderstaande tabel opgegeven, waarin ook een vergelijking is gemaakt met een medium waarin het glutaminezuur met ammonia was geneutraliseerd, en dat dus stikstof van tweeërlei soort bevatte.

Zoals de tabel 1 doet zien blijft de gistingsgrens in het nieuwe medium iets achter bij die in lactose-peptonwater, terwijl wij bovendien constateerden, dat ook de gasvorming iets trager verloopt, zoodat men bij 37° C. na 36 uur eindresultaten heeft en bij 45° C. eerst na 48 uur.

Bij deze watermonsters hadden wij echter van ieder medium slechts één verdunningsreeks geënt, zoodat de kleine afwijkingen in de gistingsgrenzen ook toevallig konden zijn. Daarom werden nog eens vier watermonsters onderzocht en hiervan nu in ieder

TABEL 1.
Grenzen der gisting bij 37° C. in:

Herkomst van het water.	Glucose- peptonwater.	Lactose- peptonwater.	Lactose Na- glutaminaat.	Lactose NH ₄ - glutaminaat.
Loosdrecht	1 cc.	1 cc.	1 cc.	3 cc.
Naardermeer	3 cc.	1 cc.	3 cc.	1 cc.
Vecht	1 cc.	—1	1 cc.	—1
Abcoudermeer	1 cc.	1 cc.	2 cc.	3 cc.
Vijver	—1*)	—1	1 cc.	—1
Gracht	—1	—2	—1	—2
Riool	—5	—6	—4	—6

*) 10⁻¹ cc.

Grenzen der gisting bij 45° C. in:

Herkomst van het water.	Glucose- peptonwater.	Lactose- peptonwater.	Lactose Na- glutaminaat.	
Loosdrecht	25 cc.	10 cc.	25 cc.	
Naardermeer	25 cc. neg.	10 cc.	25 cc. neg.	
Vecht	1 cc.	—1	1 cc.	
Abcoudermeer	2 cc.	1 cc.	2 cc.	
Vijver	—1	—1	—1	
Gracht	—1	—2	1 cc.	
Riool	—5	—5	—4	

medium 5 reeksen ingezet. Bovendien werd de gevoeligheid t.o.v. *B. coli* nog eens nagegaan door suspensies van reïncultures te verdunnen en ook deze vijfvoudig te enten in de verschillende media.

In onderstaande tabellen 2 en 3 zijn de uitkomsten vermeld:

Uit deze gegevens ziet men dat de uitkomsten voor 37° C. practisch gelijk zijn, terwijl bij 45° C. de glutaminaatvloeistof iets achterblijft.

Ook wat de bevestiging op *B. coli* betreft is niet veel verschil te constateeren. Hier gaf juist de kweeking bij 45° C. betere resultaten, zooals de onderstaande tabel 4 te zien geeft.

Ter contrôle overtuigden wij ons, dat andere eenvoudige en in den handel verkrijgbare aminozuren, zooals glycocol, asparaginezuur en asparagine, niet de voorkeur zouden verdienen boven het glutaminezuur.

Hiertoe werden *B. coli*, *B. cloacea* en *A. aerogenes* geënt in media die op dezelfde wijze waren samengesteld als het glutaminaatmedium, maar dan het betreffende amino-
zuur in een

TABEL 2.

Grenzen der gisting bij 37° C. in:

Herkomst van het water.		Glucose-pepton-water.	Lactose-pepton-water.	Lactose Na-glutaminaat.	Lactose NH ₄ -glutaminaat.
Gracht	Verdunning Aantal pos.	-1 -2 -3 5 5 2	-1 -2 -3 5 3 1	-1 -2 -3 5 3 0	-1 -2 -3 5 5 1
Vijver	Verdunning Aantal pos.	1 -1 -2 5 4 1	1 -1 -2 5 3 1	1 -1 -2 5 3 0	
Gracht	Verdunning Aantal pos.	-1 -2 -3 5 3 2	-1 -2 -3 5 5 3	-1 -2 -3 5 3 1	
Gracht	Verdunning Aantal pos.	-1 -2 -3 5 5 0	-1 -2 -3 5 3 1	-1 -2 -3 5 4 1	
Verdunning v. e. colisuspensie I	Verdunning Aantal pos.		-7 -8 -9 5 3 0	-7 -8 -9 5 3 0	
Idem II	Verdunning Aantal pos.		-7 -8 -9 5 5 0	-7 -8 -9 5 5 1	

TABEL 3.

Grenzen der gisting bij 45° C. in:

Herkomst van het water.		Glucose-peptonwater.	Lactose-peptonwater.	Lactose Na-glutaminaat.
Gracht	Verdunning Aantal pos.	1 -1 -2 5 2 0	1 -1 -2 5 4 1	1 -1 -2 5 3 0
Vijver	Verdunning Aantal pos.	1 -1 -2 5 2 0	1 -1 -2 5 3 0	1 -1 -2 4 1 0
Gracht	Verdunning Aantal pos.	1 -1 -2 5 5 2	1 -1 -2 5 5 3	1 -1 -2 5 3 2
Gracht	Verdunning Aantal pos.	1 -1 -2 5 2 0	1 -1 -2 5 4 1	1 -1 -2 5 3 0

TABEL 4.

	Aantal buizen onderzocht.	Aantal bevestigd.	Aantal neg.
Lactose-peptonwater 37° C.	35	30	5
Lactose-Na-glutaminaat 37° C.	72	61	11
Glucose-peptonwater 37° C.	35	28	7
Lactose-peptonwater 45° C.	34	33	1
Lactose-Na-glutaminaat 45° C.	50	49	1
Glucose-peptonwater 45° C.	29	26	3

concentratie van 1% bevatten. Hierbij bleek, dat *B. coli* in geen der media met glyocol, asparagine en Na-asparaginaat gisting veroorzaakte. *B. cloacea* en *A. aerogenes* brachten slechts na 60 uur een zwakke gisting te weeg, terwijl met glutaminezuur deze drie soorten na 24 uur reeds gisting verwekten. Hieruit blijkt dus, dat onze keus inderdaad juist was..

Vervolgens gingen wij ook na of de bekende nadeelen van lactose-bouillon (groei van *Cl. Welchii* of *Aerobac. polymyxa* of „symbiotic complexes”) ook bij gebruik van het lactose Na-glutaminaatmedium aanwezig waren.

Uit proeven met reïncultures bleek, dat *Cl. Welchii* in samenwerking met een aërobe sporenvormer, in dit geval *Bac. subtilis*, in deze vloeistof werkelijk groeide onder zuur- en gasvorming; *Aërobac. polymyxa* (*Bac. aërosporus*) vormde slechts zuur en geen gas. Ook *Bact. proteus* in samenwerking met *Str. fecalis* was niet in staat gisting in dit medium te weeg te brengen.

Uit deze voorloopige proeven mag men de conclusie trekken, dat de bruikbaarheid van het lactose-natriumglutaminaatmedium weinig verschilt met die van lactose-peptonwater. Het heeft echter ook dezelfde bezwaren, daar de anaërobe sporevormers hierin ook gisting verwekken. Of bij gebruik van dit medium in de praktijk, de „false presumptive tests” in gelijke mate zullen voorkomen als bij lactose-bouillon, zullen meer uitgebreide proeven moeten uitmaken.

Toch kan men naar ons inzicht de voorkeur aan het glutaminaat-medium geven wegens het groote voordeel der uniforme samenstelling, waardoor men de verschillen in samenstelling en bruikbaarheid tusschen de verschillende peptonsoorten (Witte, Poulenc, Poulenc pepsique, Cogit, Difco, Bacto etc.) uit den weg kan gaan.

Tenslotte gingen wij ook na of men voor het aanleggen van telplaten de bouillongelatine en -agar zou kunnen vervangen door natriumglutaminaatgelatine en -agar. Hiertoe werden van eenige watermonsters met deze vier bodems de kiemgetallen bepaald, waarbij de gelatineplaten 5 dagen bij 22° C. en de agarplaten 3 dagen bij 37° C. werden bebroed. De resultaten volgen hier onder. (tabel 5).

Gebruik van ammonium-glutaminaat gaf geen groote voordeelen, maar wel het nadeel, dat bij steriliseeren der vloeistof een tamelijk sterke verschuiving der pH plaats had en boven-

TABEL 5.
Kiemgetal per cc.

Watersoort.	Bouillon- agar.	Na-glutaminaat- agar.	Bouillon- gelatine.	Na-glutaminaat- gelatine.
Duin	—	—	60	—
Loosdrecht . .	—	—	500	350
Naardermeer .	—	—	1200	1300
Vecht	—	—	73000	120000
Abcoudermeer .	—	—	1000	550
Vijver	—	—	1500	1900
Gracht	1100	1300	23500	44600
Riool	380000	380000	9500000	4400000
Gracht	500	350	6100	16500
Vijver	220	140	9100	8700

dien, dat de met water geënte vloeistoffen vaak sterk visceus werden, waarschijnlijk als gevolg van de ontwikkeling van slijmvormende colisoorten (*B. aërogenes*?).

Ook hier lijkt dus de vervanging der bouillonmedia verdedigbaar. Wij gelooven, dat de uniformiteit bij het wateronderzoek erbij gebaat zou zijn. Intusschen zullen onderzoeken op uitgebreider schaal noodig zijn om de waarde voor de dagelijksche controle in waterleidingbedrijven vast te stellen.

Samenvatting.

In het d-glutaminezuur werd een chemisch zuivere, relatief goedkoope stof gevonden, die het pepton in de voedingsbodems voor het bacteriologische wateronderzoek lijkt te kunnen vervangen; waarmede de moeilijkheden uit de wereld zouden zijn, die, vooral bij het colionderzoek, kleven aan het gebruik van peptonen van verschillende herkomst. Hoewel het niet mogelijk bleek, de „false presumptive tests” geheel te vermijden, wordt toch het voordeel groot genoeg geacht om een proefneming op grooteren schaal in waterleidingbedrijven aan te bevelen.

SUMMARY.

The fact is stressed, that in bacteriological wateranalysis many „false presumptive tests” occur, where *B. coli* can not be isolated from strongly fermenting tubes. The view is held, that an improvement may be possible, when substituting peptone

by a nitrogen compound, that is easily taken by *B. coli* and not by the organisms causing the false presumptive test. Therefore d-glutamic acid (as a sodium- or ammoniumsalt) is tried and found to be perfectly suitable to grow *B. coli*, but equally good to the other organisms. Nevertheless glutamic acid has a distinct advantage on peptone, being a chemically pure and relatively cheap substance, so that difficulties, arising from the use of different brands of commercial peptones, of unknown composition, may be avoided. Investigation of natural waters, using a solution of 1% lactose, 1% glutamic acid, 0.1% K_2HPO_4 and 0.05% $MgSO_4$ in distilled water, coloured with bromo thymol blue and neutralised with sodium hydroxide to pH 7.0, gives the same results as the same liquid, wherein peptone (Witte) substitutes the glutamic acid. Further experience will have to decide on its suitability in large scale practice.

LITERATUUR.

- (1) W. Kauffmann, *Aerobe sporevormende bacteriën in verontreinigd water*. Dissertatie, Amsterdam 1934.
 - (2) C. O. Schaeffer, *Persoonlijke mededeeling* (niet gepubliceerd).
 - (3) T. Folpmers, *Ned. Tijdschrift v. Hygiëne enz.* 3, 281, (1929).
 - (4) L. E. den Dooren de Jong, *Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces*. Dissertatie, Delft 1926.
-

Vergelijkende resultaten, verkregen door vervanging van pepton (Witte) door glutaminezuur, etc. als stikstofbron bij de Eykmanproef met oppervlaktewater in verschillende reinigingsstadia.

DOOR

Dr. T. FOLPMERS.

Leider van het Waterwerk der Drinkwaterleiding te Rotterdam.

In een vorige vergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie heeft de heer Kaufmann een belangwekkende mededeeling gedaan over de vervanging van pepton door glutaminezuur als stikstofbron bij de Eykmanproef. Deze mededeeling was daarom zoo belangwekkend, omdat het glutaminezuur een wel gedefinieerde organische verbinding is van bekende constante chemische samenstelling, hetgeen allermint van pepton gezegd kan worden. Pepton toch wordt gewoonlijk bereid door splitsing van dierlijke (plantaardige) eiwitten door enzymen, waaruit reeds onmiddellijk volgt, dat het een zeer gecompliceerd mengsel van organische verbindingen is. Van welken invloed de mate van splitsing op het resultaat der Eykmanproef en op coligistingen in het algemeen is, blijkt uit vele publicaties.

Elk groot industrieland nu bereidt en brengt op de markt eenige soorten pepton; bij den inkoop laat men zich dikwijls alleen door den prijs leiden, totdat men bij de proefnemingen met coligistingen o.a. op allerlei moeilijkheden stuit. Een typisch voorbeeld uit eigen ervaring moge ik hier aanhalen.

Rotterdam voorziet de stad Delft voor een groot gedeelte van leidingwater. Prof. A. J. Kluyver had mij er nu op attent gemaakt, dat bij vele proefnemingen van zijn studenten in het laboratorium te Delft het leidingwater gistingsgrenzen ver-

toonde van 10 cm³, 1 cm³ en soms zelfs geringer. Een monstername te Delft op 3 Maart 1931 verricht uit de betreffende kraan, waarbij het genomen monster in tweeën gedeeld werd voor gelijktijdig onderzoek te Delft en te Rotterdam, moest hier opheldering geven. Te Rotterdam werd met de Eykmanproef bij 45° C. en de Mac Conkeyproef met lactose bij 37° C. in 100 cm³ water geen coli aangetoond; werd echter uit de laatste cultuurvloeistof het taurocholzuurnatrium weggelaten, dan werd na 2 × 24 uren gisting verkregen in open kolfjes tot en met 10 cm³ leidingwater. Noch uit 50, 25 of 10 cm³ kon echter na uitstrijken, isoleeren en reinkweken coli worden gekweekt.

Te Delft werden door Dr. Elema, destijds assistent van Prof. Kluyver van de gistingsproef volgens Eykman van 50, 25, 10 en 1 cc elk zes Einhornkolfjes ingezet en tegelijkertijd volgens de Amerikaansche ophoopingsmethode in lactose-bouillon van 25, 10, 1 en 0.1 cc eveneens elk zes Einhornkolfjes.

Na 48 uur was het resultaat voor de Eykmanproef aldus, bij 45° C.

cc	a	b	c	d	e	
50	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	—
10	+	+	+	—	—	—
1	+	—	—	—	—	—

} na 5 à 6 dagen alle kolfjes positief,
enkele zeer veel gas.

Voor de Amerikaansche ophoopingsmethode.

	na 48 uur						na 3½ dag (6 Maart)					
cc	a	b	c	d	e	f	a	b	c	d	e	f
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—

De conclusie van den heer Elema luidde, na uitgebreid onderzoek:

„Uit de geconstateerde gistingen in de gistingsproeven „volgens Eykman en de Amerikaansche ophoopingsmethode „werden geen bacteriën, behorende tot de coli-aerogenesgroep „geïsoleerd. Daarentegen werden vrijwel alleen sporenvormen- „de bacteriën aangetroffen, zoowel aërobe geen gisting verwek- „kende, als aërobe gisting verwekkende, behorende tot het „geslacht Clostridium. Tevens werd uit een der gistingen een

„facultatief aërobe sporenvormer geïsoleerd, welke in staat is „lactose te vergisten (Bac. polymyxa?).

„Twee van de drie reingekweekte anaërobe sporenvormers „bleken in staat in symbiose met een aërobe sporenvormer lactose te vergisten”.

De oorzaak van de verschillende gistingsgrenzen te Delft en te Rotterdam (met de Eykmanproef en de Mac Conkeyproef waren hier alle gistingen ook met 100 cm³ na 48 uren negatief) bleek te wijten aan het gebruik van verschillende peptonsoorten. Te Delft was pepton Poulenc, een vergesplitste pepton, te Rotterdam pepton Witte gebruikt. Ook in Amerika, waar vergesplitste peptonen (Bacto, Difco) gebruikt worden, heeft men daarom moeten invoeren het begrip van de „presumptive test”, terwijl ook hier meermalen het verschijnsel van de z.g. symbiotische gisting optreedt. Dit alles leidt tot vertraging van de resultaten der gistingssproeven en is derhalve met de praktijk van de controle op een waterleidingbedrijf volstrekt onverenigbaar.

Het is dus zeer de moeite waard, te onderzoeken of in de praktijk pepton, door een wel gedefinieerde stof als het glutaminezuur kan worden vervangen.

Als watersoorten werden gekozen:

1e het bovenwater der snelfilters (snelf. ongefiltr.), zijnde rivierwater, dat alleen een bezinkingsproces gedurende 10—12 uren heeft doorgemaakt;

2e ditzelfde water, nadat het de snelfilters gepasseerd is (filtratiesnelheid 4—5 m per uur), genaamd: snelf. gefiltr.;

3e het water, nadat het door de langzame zandfilters is gefiltreerd (gemengd monster), genaamd: ongechloreerd leidingwater.

Steriele voorraadflesschen werden met elk der drie watersoorten gevuld en hiermede de coliproeven ingezet volgens Eykman en de 1 % glutaminezuurproef. Van het bovenwater der snelfilters werden de proeven ingezet met 10, 1, 0.2, 0.04 en 0.008 cm³ water; van de 2e watersoort met 10, 1, 0.2 en 0.04 cm³ water en van de 3e watersoort met 25, 50 en 100 cm³ water.

De vergelijkingsvoedingsmedia werden als volgt bereid:

a. 25 gram d. glutaminezuur en 12.5 gram K₂HPO₄ worden in 350 cm³ gedest. water opgelost met 27—28 cm³ 5 N.NaOH;

b. 25 gram glucose en 12.5 gram keukenzout (Ned. Pharmacope Ed. V.) worden in 150 cm³ gedest. water opgelost.

a en b worden apart gesteriliseerd in het stoombad gedurende 1 uur, daarna gemengd en in kolfjes van b.v. 100 cm³ verdeeld. De gemengde oplossing moet na 5-voudige verdunning met leidingwater (pH 7.5—7.6) een pH bezitten van 7.0, zoodat dit de waterstofionenconcentratie is, waarin tenslotte gekweekt wordt. De voedingsmedia zijn ook na menging met leidingwater volmaakt helder en kleurloos.

De voedingsvloei-stof volgens Eykman wordt ook met gedestilleerd water gemaakt. De pepton („Witte”) wordt afzonderlijk in gedestilleerd water en de glucose met NaCl tezamen en het K₂HPO₄ in een 3e hoeveelheid gedestilleerd water apart gesteriliseerd. Gekweekt wordt in de daarna gemengde vloeistof met 1% pepton, 1% glucose, ½% NaCl en ⅓% K₂HPO₄.

De kweektemperatuur is van beide voedingsmedia 45° C. in fleschjes met ingeslepen stop. Het d. glutaminezuur was geheel zuiver, zooals bleek uit de draaiing door dr. de Graaf op den Keuringsdienst van Waren te Rotterdam onderzocht, terwijl het smeltpunt of beter ontledingspunt door Prof. Verkade overeenkomstig de opgegeven waarde werd bevonden.

Toen met het glutaminezuur als eenige stikstofbron reeds 31 waarnemingen met de drie watersoorten verricht waren, heb ik daarnaast proeven genomen met een derde voedingsmedium, waarin de helft van het glutaminezuur vervangen was door het racemische ammoniumlactaat, in den handel verkrijgbaar als pl.m. 80% oplossing. De bereiding van dit laatste voedingsmedium wordt daardoor niet meer ingewikkeld, daar men nu voor den voedingsbodem a: 12.5 gram d. glutaminezuur + 12.5 gram ammoniumlactaat en 12.5 gram K₂HPO₄ met 12—13 cm³ 5 N. natronloog in 350 cm³ gedestilleerd water oplost en verder handelt als boven vermeld.

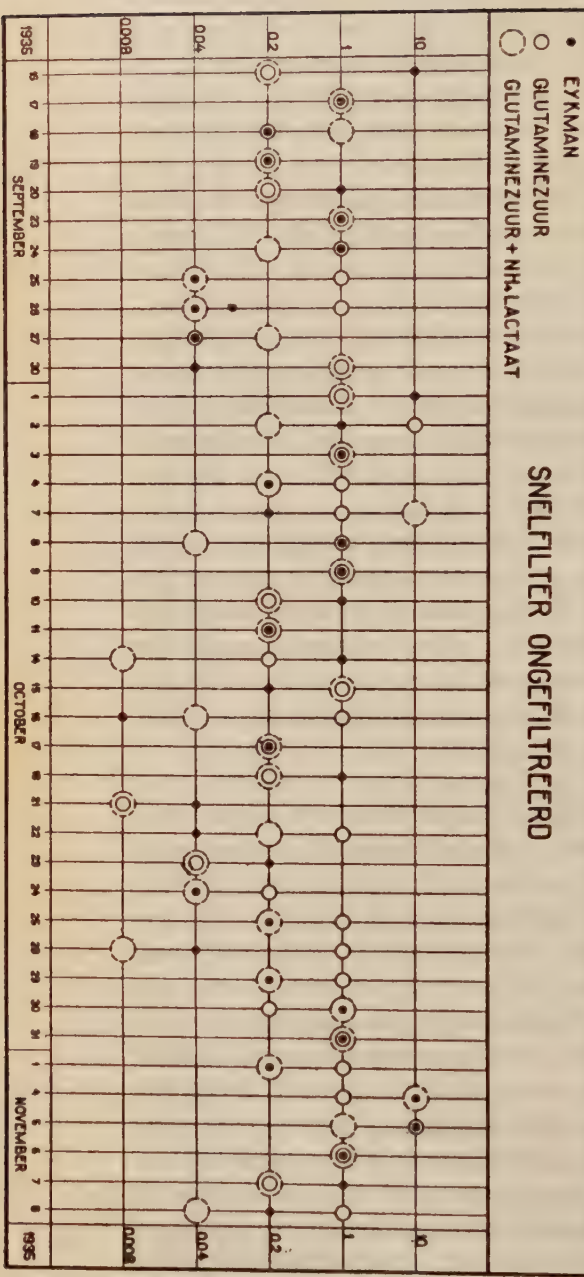
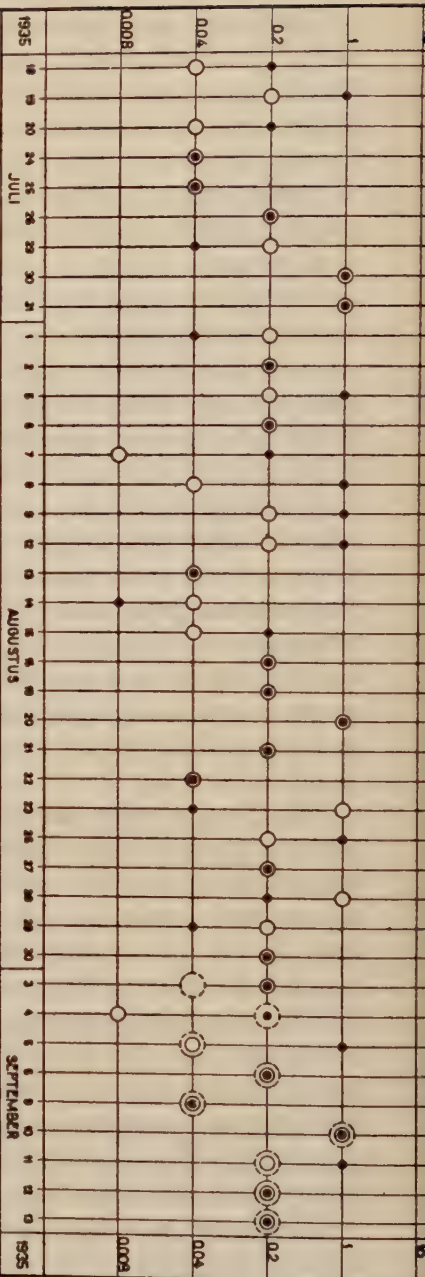
Het ammoniumlactaat werd daarom gekozen, omdat mij uit de dissertatie van Den Dooren de Jong: „Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces”, Delft 1926, Tabel XXVIII Bijlage M, bekend was, dat onder de weinige zuren, die coliachtige organismen goed kunnen assimileeren, het melkzuur behoort, terwijl de NH₄ groep voor stikstofbron in aanmerking kan komen. De voedingsbodem wordt er bovendien nog goedkoper door.

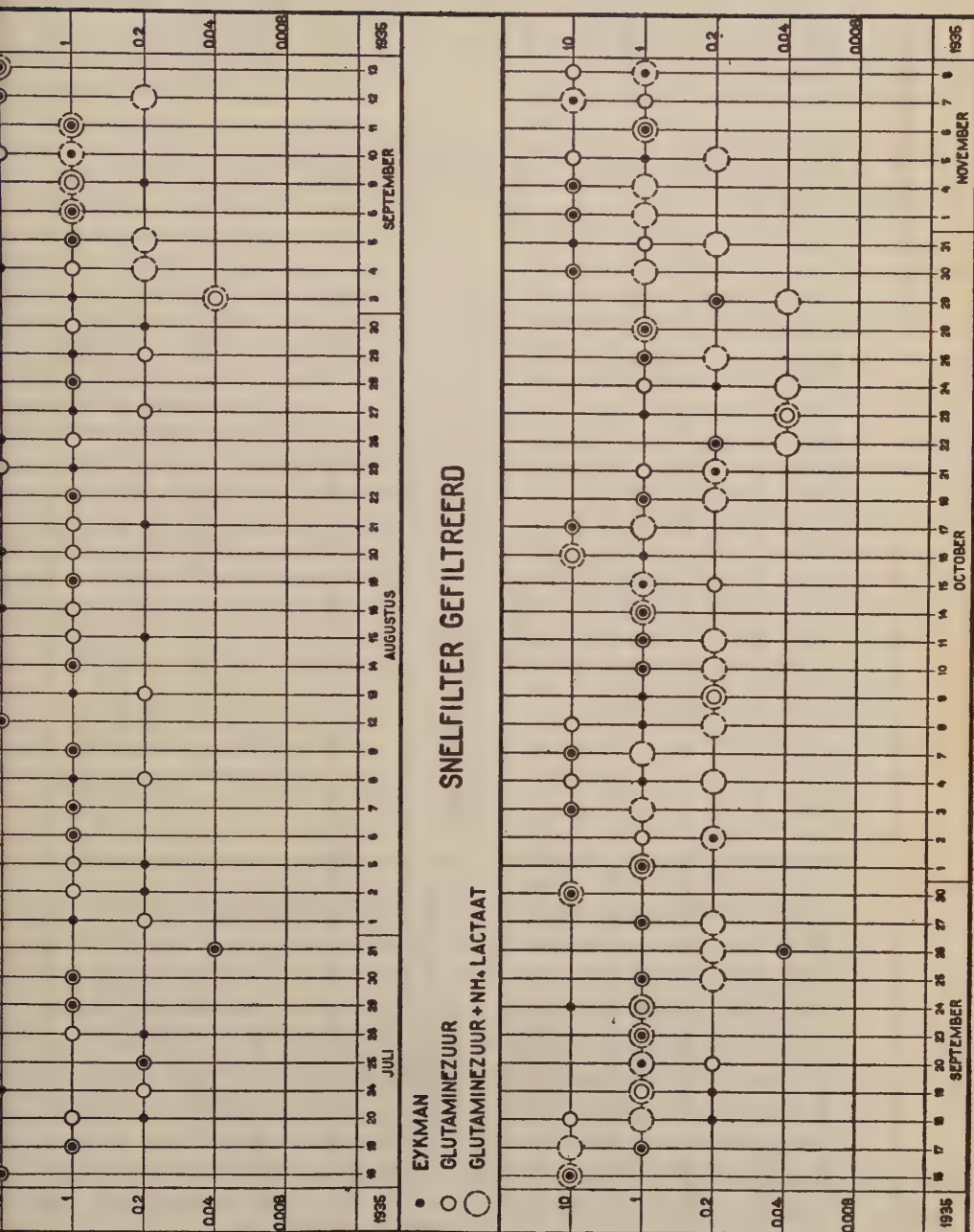
Van 18 Juli 1935 tot 30 Augustus beschik ik dus over 31 vergelijkende proefnemingen van de beide eerste voedingsmedia, van 3 September tot 8 November nog over 49 vergelijkende proefnemingen, dus in totaal 80, terwijl bij de vermelde 49 proeven de resultaten der drie voedingsmedia vergeleken kunnen worden.

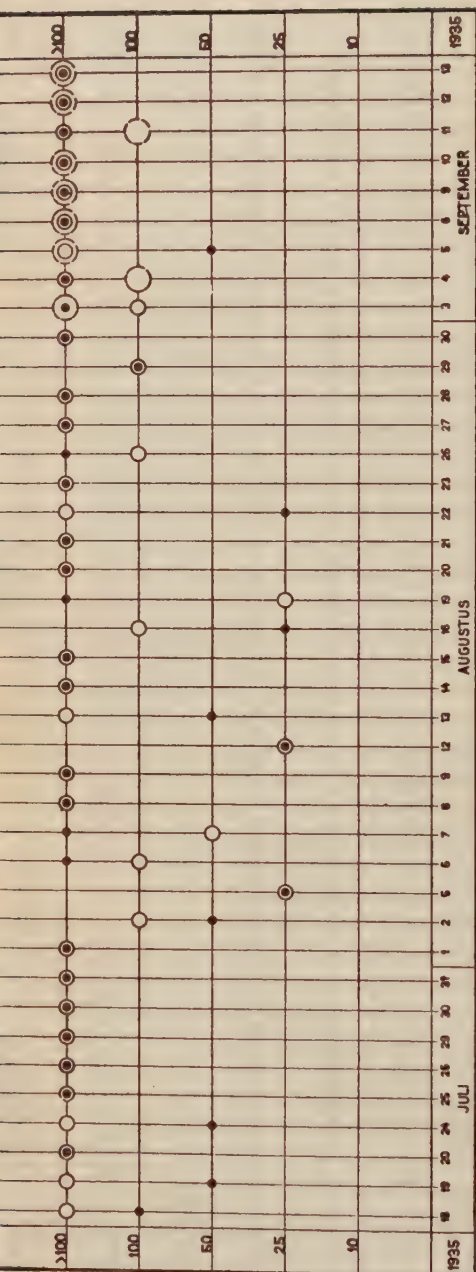
De gistende culturen na 24 uren en tevens de daar nog bijgekomen positieve gistingen na 48 uren werden alle op moutgelatine uitgestreken. Op dezen voedingsbodem is n.l. *Aerobacter aërogenes* gemakkelijk van echte coli te onderscheiden. *Aerobacter aërogenes* vormt hierop slijmige, witte kolonies, echte coli zeer platte, sterk zuur vormende kolonies. Een positieve gisting, welke op de uitstrijking alleen *Aerobacter aërogenes* liet opkomen, werd als negatief aangemerkt. Van de uitstrijkingen, vooral met de kleinste waterhoeveelheden, werden herhaaldelijk reinculturen gekweekt, die dan op de eigenschappen van echte coli volgens de Amerikaansche methode werden onderzocht. Zoowel voor de glutaminezuurproef, als voor de glutaminezuurproef met NH_4 lactaat blijkt het echter noodig 2×24 uren te culviteeren bij 45°C . De verkregen gegevens werden grafisch voorgesteld, waarbij de resultaten vermeld zijn na 48 uren kweken met de kleinste waterhoeveelheden, waarin bij uitstrijken echte coli werd aangetroffen.

Uit de grafische voorstellingen krijgt men reeds direct den indruk, dat de Eykmanproef en de glutaminezuurproef nagenoeg gelijke gistingsgrenzen opleveren; de glutaminezuur + NH_4 lactaatproef echter lager dan de beide andere proeven. Duidelijker wordt dit wanneer men bij de eerste 31 proefnemingen de resultaten der gistingsgrenzen van de Eykmanproef met die van de glutaminezuurproef vergelijkt en daarbij nagaat hoe dikwijls gelijke gistingsgrenzen verkregen werden voor de drie watersoorten en hoe dikwijls hetzij de Eykmanproef, hetzij de glutaminezuurproef, lagere grenzen aangeeft. Strekt men dit ook uit voor de beide proeven tot de 80 waarnemingen van 18 Juli—8 November 1935, dan krijgt men de nevenstaande tabel.

Vergelijkt men daarop bij de 49 waarnemingen van 3 Augustus tot 8 November 1935, hoe dikwijls de Eykmanproef, de glutaminezuurproef en de glutaminezuur + NH_4 lactaatproef gelijke gistingsgrenzen of één der beide andere gistingsproeven

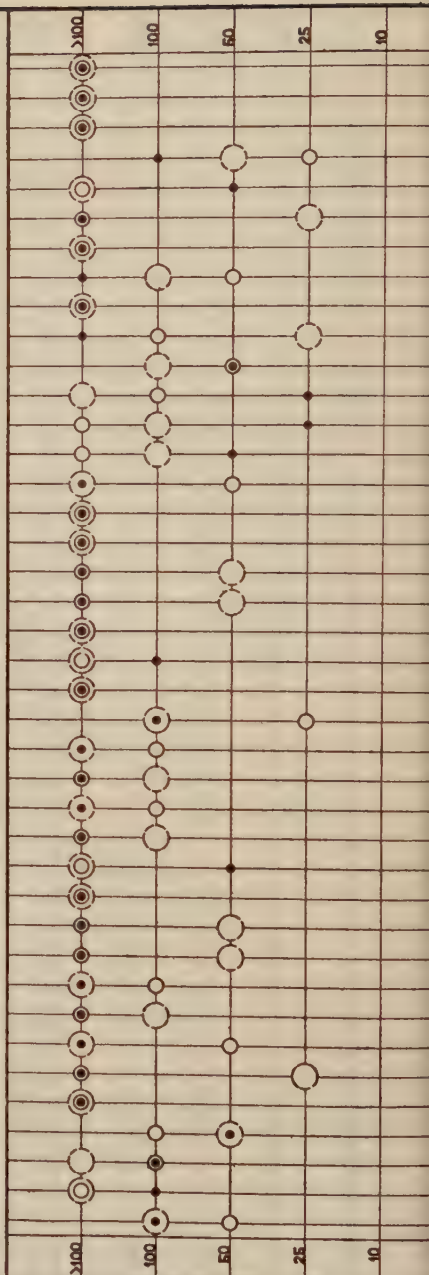






ONGECHLOREERD LEIDINGWATER

- EYKMAN
- GLUTAMINEZUUR
- GLUTAMINEZUUR + NH₄ LACTAAT



Aantal waarn. Eykm.—Glutam. zuur 18 Juli— 3 Augustus	Sf. O 31	Sf. G. 31	L. (O) 31
Eykman = Glutaminezuur	16	14	20
" > "	6	8	7
" < "	9	9	4
Aantal waarn. Eykm.—Glutam. zuur 18 Juli—8 November	Sf. O 80	Sf. G 80	L. (O) 80
Eykman = Glutaminezuur	35	42	49
" > "	22	20	16
" < "	23	18	15

onderling gelijke of verdere grenzen gaf, dan ontstaat de volgende tabel.

Aantal waarn. Eykman—Glutam. zuur—Glutamin- zuur + $\text{NH}_4\text{lact.}$ 3 Augustus—8 Nov.	Sf. O 49	Sf. G 49	L. (O) 49
Eykman = Glutam.z. = Glutam.z + $\text{NH}_4\text{lact.}$. .	14	10	16
Eykman = Glutaminezuur	5	18	13
" > "	16	12	9
" < "	14	9	11
Eykman = Glutaminezuur + $\text{NH}_4\text{lactaat}$	10	7	9
" > " + "	7	6	10
" < " + "	18	26	14
Glutaminezuur = Glutaminezuur + $\text{NH}_4\text{lactaat}$. .	12	7	5
" > " + "	6	5	13
" < " + "	17	27	15

Hetgeen boven gezegd is over de nagenoeg gelijke gistingsgrenzen voor de Eykmanproef en de glutaminezuurproef blijkt nu overtuigender evenals de lagere gistingsgrenzen, die men verkrijgt wanneer men bij de glutaminezuurproef de helft van het glutaminezuur vervangt door ammoniumlactaat.

Dat het noodig is bij de glutaminezuurproef en de glutaminezuur + $\text{NH}_4\text{lactaat}$ proef, doch ook bij de Eykmanproef, om 2×24 uren bij 45°C. te cultiveeren, blijkt uit de volgende tabel, waarin van 49 waarnemingen vermeld is, hoe dikwijls bij de drie voedingsmedia gedurende den tweeden dag de coligrens verlaagd werd en hoeveel verdunningen (grenzen) de verlaging betrof.

Glutaminezuur (N bron)		
Snelf. (O.)	Snelf. (G.)	Leidingw. (Ongechl.)
40 × verlaagd	26 × verlaagd	13 × verlaagd
1 × 4 grenzen		
3 × 3 "	2 × 3 grenzen	
13 × 2 "	8 × 2 "	
23 × 1 "	16 × 1 "	
Glutaminezuur + NH ₄ lact. (N bron)		
18 × verlaagd	17 × verlaagd	9 × verlaagd
2 × 3 grenzen		
5 × 2 "	7 × 2 grenzen	
11 × 1 "	10 × 1 "	
Pepton Witte (N bron)		
5 × verlaagd	0 × verlaagd	3 × verlaagd
1 × 2 grenzen		
4 × 1 "		

De Eykmanproef blijkt dus het vlugste de coligrens aan te wijzen, doch gaat niet zoover als de glutaminezuur + NH₄ lactaatproef. De oorzaak ligt zeer waarschijnlijk aan de sterke zuurvorming bij de Eykmanproef door zuurvormende micrococen, welke de colibacteriën in hun groei belemmeren.

In de volgende tabel is opgenomen hoe vaak bij de 49 ver-

Gistingen, alleen veroorzaakt door Aerob. aërog.		
Glutaminezuur		
Snelf. (O.)	Snelf. (G.)	Leidingw. (Ongechl.)
0.008 cc 1 ×	0.2 cc 4 ×	25 cc
0.04 cc 4 ×	1 cc 2 ×	50 cc 1 ×
0.2 cc 3 ×	10 cc 1 ×	100 cc 4 ×
Glutaminezuur + NH ₄ lactaat		
0.008 cc 1 ×	0.04 cc 4 ×	25 cc 2 ×
0.04 cc 3 ×	0.2 cc 2 ×	50 cc 2 ×
0.2 cc 1 ×	1 cc 1 ×	100 cc
Eykman		
0.008 cc 1 ×	0.2 cc 1 ×	25 cc 2 ×
0.04 cc 3 ×	1 cc 1 ×	50 cc 2 ×
0.2 cc 1 ×		100 cc 1 ×

melde waarnemingen bij de verschillende verdunningen de gisting alleen veroorzaakt was door *Aerob. aërogenes*.

Uit de tabel blijkt, dat zoowel de glutaminezuurproef als de glutaminezuur + NH_4 lactaatproef meer gistingen geven, alleen door *Aerobacter aërogenes* veroorzaakt, dan de Eykmanproef.

Vervolgens is nagegaan hoe vaak bij de 49 waarnemingen bij de verschillende verdunningen de gisting alleen veroorzaakt was door boterzuurbacteriën en in de onderstaande tabel vereenigd.

Gistingen, alleen veroorzaakt door boterzuurbacteriën		
Glutaminezuur		
Snelf. (O.)	Snelf. (G.)	Leidingw. (Ongechl.)
0.04 cc 1 ×	0.2 cc 1 ×	100 cc 2 ×
Glutaminezuur + NH_4 lactaat		
0.2 cc 3 ×	alle grenzen 0 ×	25 cc 1 × 50 cc 0 × 100 cc 5 ×
Eykman		
0.008 cc 1 ×	0.04 cc 2 ×	25 cc 2 ×
0.04 cc 0 ×		50 cc 1 ×
0.2 cc 3 ×	0.2 cc 5 ×	100 cc 4 ×
1 cc 1 ×	1 cc 1 ×	

De Eykmanproef geeft na 48 uren dus meer aanleiding tot boterzuurgisting. Is ze dus iets in het voordeel door het geringere aantal *Aerob. aërogenes*gistingen, na 48 uren kweken is ze beslist in het nadeel door het grootere aantal boterzuurgistingen.

Ook heb ik een aantal proeven gedaan, waarbij de pepton (Witte) vervangen was respectievelijk door: $\frac{1}{2}\%$ asparaginezuur + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat; 1% asparaginezuur; $\frac{1}{2}\%$ asparagine + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat; 1% NH_4 lactaat; $\frac{1}{2}\%$ alanine + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat. Het asparaginezuur werd gekozen als zijnde het voorafgaande homoloog van het glutaminezuur. Het zuur met een CH_2 groep minder dan het asparaginezuur is het mono-amino-malonzuur, dat evenwel bij kookhitte gemakkelijk koolzuur afsplitst en overgaat in het glyocol.

Er werden derhalve ook proeven genomen met een oplos-

sing, waarin de 1% pepton (Witte) vervangen was door gly-cocol.

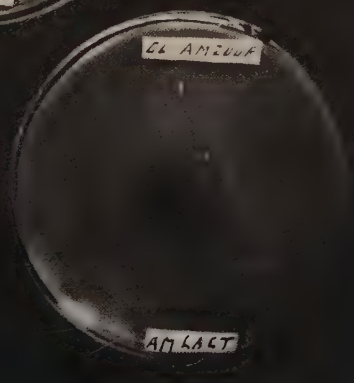
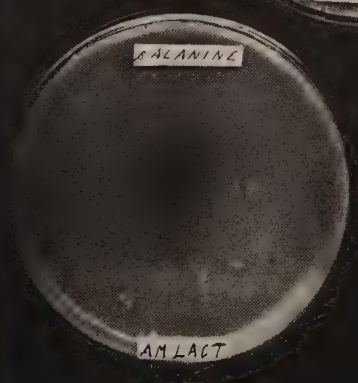
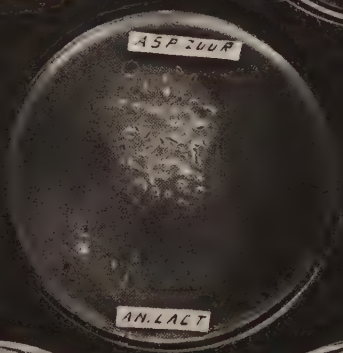
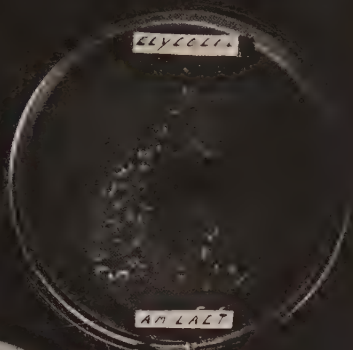
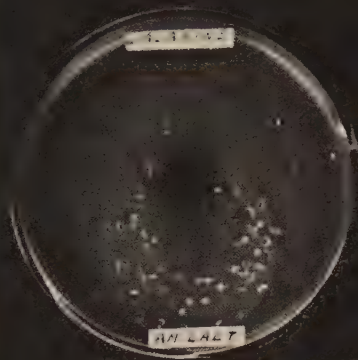
Vervanging in het voedingsmedium van de Eykmanproef van de 1% pepton (Witte) door 1% $\text{NH}_4\text{lactaat}$ maakte dit medium veel moeilijker vergistbaar. Na 24 uur toch was de gisting met het ammoniumlactaat met 10 cm^3 water (snelf. ongef.iltr.) en 10 cm^3 water (snelf. gef.iltr.) op 3 uitzonderingen na in 10 dagen steeds negatief, terwijl dan soms deze na 2×24 uren positief werd en sporadisch doorging tot 1 cm^3 , terwijl in de overeenkomstige proeven met de glutaminezuur + $\text{NH}_4\text{lactaat}$ proef de gisting na 24 uren reeds positief was met 0.02 of 0.04 cm^3 .

Terwijl dus de voedingsmedia met 1% glutaminezuur en met 1% $\text{NH}_4\text{lactaat}$ alleen gisting geven met grootere waterhoeveelheden, geeft hun combinatie in gelijke percentages betere resultaten na 2×24 uren dan de Eykmanproef met pepton (Witte) als stikstofbron.

Men kan het gistingseffect met ammoniumlactaat belangrijk verbeteren door met een Na_2SO_3 oplossing de zuurstof uit het gistingssfleschje weg te nemen. Toch gist ook dan niet na eenmaal 24 uren het voedingsmedium met de grootste hoeveelheid water n.l. 10 cm^3 , maar wel wordt nu na 2×24 uren een gelijke gistingsgrens met de $\frac{1}{2}\%$ glutaminezuur + $\frac{1}{2}\%$ $\text{NH}_4\text{lactaat}$ -voedingsbodem bereikt. De vrije zuurstof is derhalve een belemmerende factor voor de gisting.

Asparagine + $\text{NH}_4\text{lactaat}$ beide in $\frac{1}{2}\%$ oplossing als stikstofbron gaf na 24 uren in 10 dagen nooit gisting met 10 cm^3 water der beide eerstgenoemde watersoorten. Na 2×24 uren trad dan gisting in met die hoeveelheid, soms ook nog met 1 cm^3 . Asparagine is dus een minder goede stikstofbron dan het glutaminezuur.

Hetzelfde was het geval met 1% asparaginezuuroplossing als stikstofbron en ook wanneer $\frac{1}{2}\%$ asparaginezuur vervangen was door $\frac{1}{2}\%$ $\text{NH}_4\text{lactaat}$. Met beide werden 10 proefnemingen gedaan. Met de 1% asparaginezuuroplossing was na 24 uren de gisting met 10 cm^3 van de beide eerste watersoorten nooit positief, met $\frac{1}{2}\%$ asparaginezuur + $\frac{1}{2}\%$ $\text{NH}_4\text{lactaat}$ als stikstofbron slechts één keer in die 10 proefnemingen. Na 2×24 uren ging de gisting bij beide voedingsmedia ongeveer evenver als de glutaminezuur + $\text{NH}_4\text{lactaat}$ proef. Met $\frac{1}{2}\%$ α alanine + $\frac{1}{2}\%$



GLUCOSE

AM LACT

GLUCOSE

AM LACT

ASP. SURE

AM LACT

ALANINE

AM LACT

ALANINE

AM LACT

NH_4 lactaat als N bron werden ook enkele proefnemingen gedaan. Na 24 uren werd nooit in 10 cm^3 water van de beide eerste watersoorten gisting verkregen, na 2×24 uren slechts eens met die hoeveelheid water.

Wat derhalve de geschiktheid als stikstofbron bij de Eykmanproef betreft, krijgt men de volgende reeks:

$\frac{1}{2}\%$ glutaminezuur + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat; 1% glutaminezuur gelijk met (1% pepton (Witte)); $\frac{1}{2}\%$ asparaginezuur + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat; 1% asparaginezuur; $\frac{1}{2}\%$ asparagine + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat; 1% NH_4 lactaat; $\frac{1}{2}\%$ alanine + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaat.

Ook door middel van de auxanogrammen volgens Beyerinck heb ik getracht een inzicht te verkrijgen in de geschiktheid van bovenstaande verbindingen om als C en N bron te dienen voor echte colibacteriën. In zorgvuldig uitgewassen agar werd daartoe $\frac{1}{2}\%$ NaCl en $\frac{1}{2}\%$ K_2HPO_4 gebracht en even voor het stollen een oogje van een entnaald echte colibacteriën, die door voorzichtig omschudden fijn verdeeld werden in de agar. Na uitgieten werden de cultuurplaten voorzichtig gedroogd (door 1 uur b.v. in den thermostaat van 37° C. te zetten). Nu werden voorzichtig druppels van sterke oplossingen met aequivalente hoeveelheden glutaminezuur als Na-glutaminaat, asparaginezuur als Na-asparaginaat, glyocol, α en β alanine op de cultuurplaten geplaatst en op $\pm 3\text{ cm}$ in een middellijn daarvan verwijderd druppels van een aequivalente NH_4 lactaatoplossing. De druppels laat men in de cultuurplaten trekken, keert de cultuurdoozen daarop om en cultiveert nu eenige dagen bij 37° C. Het resultaat blijkt uit nevenstaande foto's.

Glyocol en β alanine geven geen groeiringen te zien. Klaarblijkelijk kan de echte coli dus onder deze voorwaarden deze beide verbindingen niet als C en N bron dissimileeren. De vlgste en beste groei treedt op met het NH_4 lactaat, vervolgens met het Naglutaminaat en Na-asparaginaat en daarop met het α alanine. Waar het Na-glutaminaat en het Na-asparaginaat, na door de agar gediffundeerd te zijn, in contact komen met het NH_4 lactaat, schijnt een versterkte groei op te treden.

Men kan nu ook nog, behalve $\frac{1}{2}\%$ NaCl en $\frac{1}{2}\%$ K_2HPO_4 , $\frac{1}{2}\%$ glucose in de cultuurplaten brengen, vervolgens de echte colibacteriën er fijn in verdeelen en daarop de aminozuren en het NH_4 lactaat brengen en de laatste dan alleen als N bron laten dienen. Men krijgt anaërobe auxanogrammen en gisting, wan-

neer men dan anaëroob cultiveert door de zuurstof door alkalische pyrogalloloplossing te laten absorbeeren. Een lapje met een alkalische methyleenblauw-glucoseoplossing volgens M. van Riemsdijk (Bacteriologische Serologische methoden en recepten, Swets en Zeitlinger, Amsterdam, 1925, blz. 130) moet geheel kleurloos worden. Na 1 of 2 dagen cultuur bij 37° C. blijkt vlak om de NH_4 lactaatdruppel de sterkste groei en gisting te zijn opgetreden bij de beide bovenste cultuurplaten. Waar de Na-asparaginaatoplossing na diffusie het NH_4 lactaat ontmoet, treedt een sterkere gisting op (meer $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ gasbelletjes); bij de Na-glutaminaatoplossing met NH_4 lactaat is merkwaardigerwijze van een versterkte gisting niets te zien.

Ook werden nog een 15-tal vergelijkende waarnemingen gedaan met het NH_4 glutaminaat als stikstofbron. Men lost dan het glutaminezuur op in gedestilleerd water met de berekende hoeveelheid sterke ammoniak inplaats van natronloog.

Worden nu de gistingsresultaten voor de vermelde drie watersoorten vergeleken van deze NH_4 glutaminaatoplossing met $\frac{1}{2}\%$ Na-glutaminaat + $\frac{1}{2}\%$ NH_4 lactaatoplossing dan blijken ze na 2×24 uren voor het ongefiltreerde bovenwater der snel-filters nagenoeg dezelfde te zijn; voor het gefiltreerde water dier filters blijkt de tweede gemengde stikstofbron de beste te zijn; voor het ongechloreerde leidingwater zijn de resultaten weer nagenoeg dezelfde. Een nadeel van het NH_4 glutaminaat is echter, dat het gemakkelijker aanleiding geeft tot boterzuurgisting en tot gisting, alleen door *Aerob. aërogenes* veroorzaakt.

Neemt men inplaats van gelijke deelen glutaminezuur en NH_4 lactaat de verhouding glutaminezuur tot het ammoniumlactaat als 1 : 3 dan blijken in 24 waarnemingen de gistingsgrenzen voor het ongefiltreerde bovenwater der snelfilters en voor het gefiltreerde water dier filters na 2×24 uren nagenoeg dezelfde. Voor het gemengde water der langzame zandfilters, waarin dus zeer weinig coli-bacteriën voorkomen, worden de resultaten met de N bron in de verhouding 1 : 3 echter slechter; ze is dus moeilijker dissimileerbaar.

Ook werd nog geprobeerd of glyocol als N bron geschikt was; zeer moeilijk trad na 2×24 uren alleen met de grootste waterhoeveelheden gisting op. Pogingen dezen voedingsbodem te verbeteren door te trachten sneller een gereduceerden toestand te bereiken door toevoeging van methyleenblauw, mis-

lukten. Zelfs 0.01% methyleenblauw verhinderde elk spoor van gisting. Werd voor dit doel hydroxylamine gebruikt dan bleek ook hier 0.1% alle gisting te beletten, indien het aan den voedingsbodem met gelijke deelen glutaminezuur + ammoniumlactaat werd toegevoegd. Alleen 0.001% had geen negatieven invloed meer. Werden reinculturen van verschillende stammen van echte coli en aërogenes in den voedingsbodem met als N bron glutaminezuur + NH_4 lactaat in gelijke deelen geënt, dan bleek alleen de echte coli bij 45°C . te kunnen gisten. Geen der aërogenesstammen sloeg aan, zelfs niet na 4×24 uren.

Een woord van hartelijken dank zij hier gebracht aan de proff. Blanksma en Kluyver, die mij verschillende organische aminozuren ter beschikking stelden.

De vorming van waterstof uit glucose en mierenzuur door z.g. „rustende” Colibacterien II

DOOR

Dr. A. TASMAN.

In de eerste mededeeling over dit onderwerp (1) werden de hierop betrekking hebbende publicaties van *Stephenson*, *Stickland* (2) en *Yudkin* (3) uitvoerig besproken en aan critiek onderworpen. Deze critiek steunde deels op overwegingen van theoretischen aard, deels op experimenteele gegevens. Wat deze laatste betreft, zij in het kort medegedeeld, dat het aan *Tasman* en *Pot* niet gelukte om op overeenkomstige wijze als de bovengenoemde Engelsche onderzoekers suspensies van colibacteriën te bereiden, welke bij anaerobe vergisting uit glucose wèl en uit natriumformiaat geèn gas vormden. Steeds ging een gasvorming ($H_2 + CO_2$) uit glucose gepaard aan gasvorming uit natriumformiaat, indien de desbetreffende bacteriesuspensie bereid was door voorafgaand kweken in of op caseïnepepton.

Onze conclusie luidde dan ook, dat de waterstof bij vergisting van glucose gevormd, in de meerderheid van de gevallen afkomstig is uit het intermediair bij deze suikerontleding optredende mierenzuur, terwijl in sommige gevallen een klein deel hiervan zijn oorsprong vinden kan in de ontleding van het glucose-molecuul via pyrodruivenzuur.

In aansluiting op deze kwalitatieve proeven zullen in deze mededeeling experimenten beschreven worden, waarbij de glucosevergisting, speciaal de vorming van waterstof en koolzuur, quantitatief nagegaan werd.

Door *Kluyver* (4) en medewerkers, waaronder vooral *Scheffer* (5) genoemd dient te worden, werd voor de vergisting van glucose door microorganismen van de coli-typhus-dysenteriegroep een algemeen vergistingsschema opgesteld, dat hieronder volgt.

De bespreking van de argumenten, welke tot dit schema geleid hebben, wordt hier achterwege gelaten. Hiervoor zij naar de bovengenoemde auteurs verwezen. Slechts enkele praktische consequenties zullen hier nader besproken worden.

Het centraal geplaatste methylglyoxaalhydraat kan op drie verschillende wijzen verder omgezet worden, te weten:

- a) een stabilisatie tot melkzuur.
- b) een ontleding in pyrodruivenzuur en waterstof.
- c) een splitsing in mierenzuur en aceetaldehydehydraat.

Het onder b) genoemde pyrodruivenzuur zal zich verder splitsen in aceetaldehyde en koolzuur, waarna dan bij de vorming van pyrodruivenzuur opgetreden waterstof een meer of minder groot gedeelte van dit aceetaldehyde tot aethylalcohol reduceeren zal. Daar in alle door ons onderzochte gevallen de uitgegiste substraten een negatieve Voges-Proskauer reactie vertoonden, kan de vorming van acetetylmethylcarbinol en 2-3-butyleenglycol buiten beschouwing blijven. De onder b) genoemde ontledingswijze van glucose noemt men het „pyrodruivenzuurschema”.

Indien de splitsing van methylglyoxaalhydraat via het mierenzuur plaats vindt (het z.g. „mierenzuurschema”) zal dit mierenzuur voor een kleiner of groter gedeelte gesplitst worden in *aequivalente hoeveelheden waterstof en koolzuur*, terwijl het bij de mierenzuurvorming ontstane aceetaldehyde omgezet zal worden in *aequivalente hoeveelheden azijnzuur en aethylalcohol*.

Wordt het „pyrodruivenzuurschema” in meerdere of mindere mate gevolgd, dan zullen waterstof en koolzuur, benevens azijnzuur en aethylalcohol *niet* in aequivalente hoeveelheden ontstaan, *doch de verhouding H_2/CO_2 moet gelijk zijn aan die van azijnzuur/alcohol*, tenzij er in het geheel geen waterstof gevormd wordt. Daar in dit geval de via de pyrodruivenzuurontleding gevormde waterstof dus in haar geheel gebruikt wordt voor de reductie van aceetaldehyde tot aethylalcohol moet *het surplus aan alcohol* d.w.z. het aantal grammoleculen aethylalcohol minus het aantal grammoleculen azijnzuur *gelijk zijn aan het aantal grammoleculen koolzuur*, die bij de ontleding van het pyrodruivenzuur ontstaan, mits het pyrodruivenzuur in zijn geheel ontleed wordt. Daar nooit pyrodruivenzuur onder de vergistingsproducten gevonden werd, mogen we dit veilig aan-

nemen. Uit het vervolg zal blijken, dat dit onder bepaalde omstandigheden inderdaad het geval is.

Wat de vorming van barnsteenzuur betreft, wordt aangenomen, dat dit direct uit de glucose ontstaat door ontleding van het suikermolecuul in twee ketens met resp. 4 en 2 C-atomen. De argumentatie van deze voorstellingswijze wordt hier achterwege gelaten.

De juistheid van dit vergistingsschema kon door de verschillende onderzoekers op overtuigende wijze aangetoond worden. Ik wil hier niet dieper op ingaan, doch slechts wijzen op de volgende twee primaire eischen, welke het schema stelt.

1. De som van de koolstof in de diverse ontledingsproducten, berekend als procenten van de in de vergiste hoeveelheid glucose aanwezige koolstof, moet ten naastebij 100 bedragen.

2. Primair worden uit één grammol glucose twee grammolen glycerinealdehyde en hieruit twee grammolen methylglyoxaalhydraat gevormd. Indien het mierenzuurschema gevolgd wordt, splitsen deze twee grammolen methylglyoxaalhydraat zich in twee grammolen mierenzuur en twee grammolen aceetaldehydehydraat, waaruit (gesteld dat uit mierenzuur volledig ontleed zou worden) tenslotte twee grammolen koolzuur, waterstof, azijnzuur en alcohol zullen ontstaan.

Indien het „pyrodruivenzuurschema” gevolgd wordt, splitsen de twee grammolen methylglyoxaalhydraat zich in twee grammolen pyrodruivenzuur en twee grammolen waterstof. Uit dit pyrodruivenzuur zullen dan ook weer twee grammolen koolzuur, azijnzuur en aethylalcohol kunnen ontstaan. Een meer of minder groot deel van de zoo juist genoemde waterstof zal echter gebruikt worden voor een extra reductie van het intermediair optredende aceetaldehyde tot aethylalcohol.

In werkelijkheid wordt echter nooit alle mierenzuur in H_2 en CO_2 gesplitst, een deel ervan wordt als zoodanig terug gevonden. Bovendien wordt een deel van het methylglyoxaalhydraat gestabiliseerd tot melkzuur. De boven zeer in het kort weergegeven gedachtengang biedt echter de mogelijkheid om de juistheid van het genoemde „schema” aan de waargenomen feiten te toetsen en wel door de hoeveelheden der optredende eindproducten om te rekenen tot de overeenkomstige hoeveelheden H_2 , CO_2 en aceetaldehyde. Is het schema „juist”, dan moeten deze hoeveelheden zoodanig zijn, dat aan 50 grammole-

culen vergiste glucose 100 grammolen H_2 , CO_2 en $CH_3-C<\overset{O}{H}$ beantwoorden. Voor deze omrekening is

1 grammol ongesplitst *mierenzuur* gelijk te stellen aan 1 grammol waterstof plus 1 grammol koolzuur;

1 grammol *aethylalcohol* = 1 grammol aceetaldehyde plus 1 grammol waterstof;

1 grammol azijnzuur = 1 grammol aceetaldehyde minus 1 grammol waterstof;

1 grammol *melkzuur* = 1 grammol aceetaldehyde plus 1 grammol koolzuur.

Wat het bij de vergisting optredende *barnsteenzuur* betreft, wordt dit verondersteld gevormd te zijn door directe ontleding van de glucose, zonder voorafgaande phosphoryleering. De hiervoor gebruikte glucose zal dan aan een verdere ontleding onttrokken worden. Wil men nu de juistheid van deze veronderstelling toetsen, dan dient men voor 1 gram gevormd barnsteenzuur $\frac{180}{118} \times 1$ gram van de door vergisting verdwenen glucose af te trekken en de overblijvende hoeveelheid als „vergiste glucose” volgens de hierboven gegeven beschouwing in rekening te brengen. Tevens zal dan van de aceetaldehydebalans per grammol gevormd barnsteenzuur 1 grammol aceetaldehyde afgetrokken moeten worden, daar zich toch naast barnsteenzuur aceetaldehyde vormt, dat verder als alcohol en azijnzuur teruggevonden wordt en in de totale hoeveelheid van deze producten als aceetaldehyde in de balans verschijnt.

Naast glucosevergistingen door suspensies van „rustende” colibacteriën werden ter vergelijking ook enkele vergistingen van glucose door groeiende coliculturen uitgevoerd. Deze vergistingen vonden onder strikt anaerobe omstandigheden plaats in een caseïnepeptonoplossing, welke met een dubbel volume 0.5% keukenzoutoplossing verdund was. De oorspronkelijke, onverdunde caseïnepepton (weer volgens *Stickland's* voorschrift bereid, zie *Cole* en *Onslow* (6) leverde n.l. bij de analyse van de uitgegiste substraten te groote moeilijkheden op. Daar de inrichting dezer proeven geheel dezelfde was, als reeds eerder uitvoerig beschreven werd (7), kan met een verwijzing naar de desbetreffende publicatie volstaan worden. Hier zij alleen nog opgemerkt dat steeds 2% glucose en 2% van te voren gesterili-

seerd krijt werd toegevoegd, dit laatste om bij de glucosevergisting ontstane zuren te binden.

De vergistingen van glucose door coli-suspensies werden als volgt uitgevoerd. In een van een uitwendige maatverdeeling voorziene pyrexkolf van 750 ccm werd 4.00 gram glucose p.a. afgewogen en in 400 ccm fosphaatbuffer $P_H = 6,2$ opgelost. De kolf werd gesloten door een dubbel doorboorde rubberstop, waar doorheen een kraantrechter met lange, tot in de vloeistof reikende steel en een éénmaal rechthoekig omgebogen, eveneens van een kraan voorzien uitvoerbuisje gingen. Kraantrechter en uitvoerbuisje waren met wattenproppen kiemdicht afgesloten. Op de gebruikelijke wijze werd de kolf met inhoud gedurende 12 min. op 115° gesteriliseerd, waarbij de kraantrechter gesloten, het uitvoerbuisje geopend was. Direct na de sterilisatie werd de tweede kraan gesloten en de kolf zoo warm mogelijk verbonden met een stikstofcylinder. De stikstof werd door alcalische pyrogalloloplossing volledig van zuurstof bevrijd. Tijdens het afkoelen zoog dus de kolf zich vol met stikstof. Daarna werd de kolf in een thermostaat van 40° C. geplaatst en het uitvoerbuisje aangesloten aan drie, onderling verbonden chloorcalciumbuisjes. Hierop volgden drie gewogen natronkalkbuisjes. De uit het laatste natronkalkbuisje uittredende gassen werden in een meetcylindertje boven paraffineolie opgevangen.

De bacterieculturen uit vloeibare media werden direct, die van vaste voedingsbodems na voorafgaand afschudden met zoutsolutie gecentrifugeerd, tweemaal met zoutsolutie gewaschen en gesuspenderd in 200 ccm, van te voren door uitkoken van CO_2 bevrijde fosphaatbuffer. Deze suspensie werd vervolgens door de kraantrechter in de gistkolf gebracht en de bol van den kraantrechter met 100 ccm uitgekookte fosphaatbuffer nagespoeld. Na ingetreden temperatuurevenwicht werd de paraffine in de meetcylinder opgezogen en de inhoud van de gistkolf van tijd tot tijd doorgeschud. De glucosevergisting zette snel in en was meestal in pl.m. 5 uur beëindigd, terwijl toch nooit meer dan pl.m. 1,8 gram glucose vergist werd. De oorzaak hiervan bleek te liggen in het feit, dat de P_H van de bufferoplossing door de vorming van de diverse zuren (mierenzuur, azijnzuur, melkzuur, barnsteen zuur) daalde tot pl.m. 4,4—4,9. Bij deze lage P_H wordt kennelijk geen glucose meer vergist. Dit feit is geheel in overeenstemming met de door *Stephenson* en *Stick-*

land waargenomen verschijnselen. Daar echter gestreefd werd naar een glucosevergisting door „rustende” colibacteriën onder zooveel mogelijk dezelfde omstandigheden als bij de proeven van *Stephenson* en *Stickland*, werd afgezien van de toevoeging van krijt, waardoor ongetwijfeld méér glucose vergist zou zijn geworden. Daar de glucosevergisting echter niet in alle gevallen met dezelfde snelheid verliep, werd steeds pl.m. 18 uur na het begin der gisting het substraat geanalyseerd.

Wat de voor de verschillende glucosevergistingen gevolgde analysetechniek betreft, kan grootendeels verwezen worden naar het hierover reeds eerder medegedeelde (7). Slechts op eenige bijzonderheden zij hier de aandacht gevestigd.

De bij de suspensiegistingen verkregen mengsels werden vóór de analyse door centrifugeeren gedurende een uur bij 3000 toeren van de bacteriën bevrijd.

De bepaling van de som der *vluchtige zuren* (azijnzuur en mierenzuur) geschiedde bij de peptongistingen op de reeds beschreven wijze, bij de suspensiegistingen daarentegen werden 200 ccm helder centrigrugaat aan een gefractioneerde stoomdestillatie onderworpen, waarbij 6 fracties van 250 ccm opgevangen en afzonderlijk getitreerd werden en aldus uit de laatste titratie de blanco-waarde gevonden werd, waarmede de voor iedere fractie van 250 ccm destillaat gebruikte hoeveelheid loog verminderd moest worden. Het geheel der 6 getitreerde fracties werd ingedampt en op de gebruikelijke wijze het mierenzuur hierin als calomel bepaald.

De *alcoholbepaling* in de uitgegiste caseïnepeptonsubstraten geschiedde in een vooraf door precipitatie met phosphorwolfraamzuur van peptonen bevrijde vloeistof, daar de alcoholbepalingen zonder deze bewerking steeds te hooge waarden opleverden.

Daar phosphorzuur in aether merkbaar oplosbaar is, werd voor de bepaling van *melkzuur* en *barnsteen* bij de suspensiegistingen, het stroomresidu vóór het indampen door neerslaan met magnesia-mixtuur van phosphaten bevrijd.

De *melkzuurbepaling* geschiedde bij de peptongistingen volgens de vroeger in details beschreven methode van *Friedemann* en *Kendall*, bij de suspensiegistingen werd de oxaalzuurmethode van *Ulzer* en *Seidel* gebruikt (8).

Het spreekt vanzelf, dat men aan de analyseresultaten van

de suspensiegistingen zeker niet dezelfde eischen van nauwkeurigheid kan stellen, welke voor de gistingen met groeiende bacteriën gelden. In het eerste geval wordt toch slechts pl.m. 1,5 gram glucose vergist tegenover 20—35 gram bij de tweede groep van glucosevergistingen. Dat dus in enkele gevallen de resultaten zéér goed zijn en bijv. de H_2/CO_2 - en azijnzuur/alcohol-quotienten opvallend met elkaar overeenkomen, zal zeker meer aan toeval dan aan werkelijke nauwkeurigheid van de analyses te wijten zijn. Speciaal geldt dit voor de bepalingen van azijnzuur, mierenzuur en koolzuur, welke bij de suspensiegistingen zeker geen hoogen graad van nauwkeurigheid bezitten.

De meeste gistproeven werden in duplo utigevoerd. Ter ruimtebesparing zal echter van ieder type van glucosevergisting slechts één voorbeeld vermeld worden.

1. Glucosevergisting door groeiende colibacteriën in caseïne pepton.

Deze werden uitgevoerd met de stammen 1452 en „Stickland”, welke steeds op caseïnepepton-agar aangehouden werden. De resultaten hiervan zijn in de tabellen 1 en 2 samengevat.

TABEL 1.

Stam: Coli 1452.

Aard der glucosevergisting: Groeiend in verdunde caseïnepepton.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 3.63 gram barnsteen- zuur is 5.54 gram glucose en 8.9 grammol acetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose .	36,60				
Teruggevonden glucose .	0.02				
Vergiste glucose	36,58	100	H_2	CO_2	$CH_3C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	0.220	—	31,9	—	—
Koolzuur . . .	5.43	10.1	—	36.2	—
Azijszuur . . .	4.88	13.3	—23.6	—	23.6
Mierenzuur . .	0.232	0.4	1.5	1.5	—
Aethylalcohol .	4.25	15.2	26.8	—	26.8
Melkzuur . .	15.6	42.7	50.2	50.2	50.2
Barnsteen- zuur .	3.63	10.1	—	—	—8.9
Totaal . .		91.8 %	86.8	87.9	91.7

$H_2/CO_2 = 0,89$.

Azijszuur/Aethylalcohol = 0,88.

TABEL 2.

Stam: Coli „Stickland”.

Aard der glucosevergisting: Groeiend in verdunde caseïnepepton.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 0.89 gram barnsteenzuur is 1.36 gram glucose en 3.1 grammol aceetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose .	34.60				
Teruggevonden glucose .	11.62				
Vergiste glucose	22.98	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	0.125	—	26.2	—	—
Koolzuur . . .	3.74	11.9	—	35.4	—
Aziijnzuur . . .	2.98	13.2	—20.8	—	20.8
Mierenzuur . .	0.769	2.2	7.0	7.0	—
Aethylalcohol .	3.62	20.5	32.5	—	32.5
Melkzuur . . .	11.0	47.9	50.9	50.9	50.9
Barnsteenzuur .	0.89	3.7	—	—	—3.1
Totaal . .		99.4 %	95.6	92.3	101.1

H₂CO₂ = 0,74.

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 0,65.

Bij beschouwing hiervan blijkt het volgende. Beide vergistingen sluiten zich geheel aan bij die, welke door *Scheffer* (5) voor colibacteriën en door *Tasman* en *Pot* (7) voor paratyphus-stammen medegedeeld werden. De vergisting geschiedt in hoofdzaak via het „mierenzuurschema”, terwijl speciaal bij de glucosevergisting door de „Stickland”-stam voor een deel ook het „pyrodruivenzuurschema,” gevolgd wordt. *De gevormde waterstof komt dus in hoofdzaak uit het intermediair gevormde mierenzuur, daarnaast voor een klein deel uit de ontleding van methylglyoxaalhydraat in pyrodruivenzuur en waterstof.*

Ter vergelijking met deze glucose vergistingen werd een gistproef uitgevoerd in een 1% Pepton-Witte-oplossing. Hiervoor werd gebruikt de stam 3812, welke nooit op caseïne-pepton gekweekt was. Het resultaat van deze proef is in tabel 3 vermeld.

Hieruit blijkt dat onder deze omstandigheid *geheel* het „mierenzuurschema” gevolgd wordt, terwijl tevens de relatief

TABEL 3.

Stam: Coli 3812.

Aard der gisting: Groeiend in 1% Pepton-Witte.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 1.98 gram barnsteenzuur is 3.02 gram glucose en 6.9 grammol acetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose . .	34.89				
Teruggevonden glucose . .	9.84				
Vergiste glucose	22.05	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C $\begin{smallmatrix} \text{=O} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	0.338	—	69.0	—	—
Koolzuur . . .	6.47	17.6	—	60.1	—
Aziijnzuur . . .	7.12	28.5	—48.5	—	48.5
Mierenzuur . .	1.25	3.3	11.1	11.1	—
Aethylalcohol .	4.78	24.9	42.5	—	42.5
Melkzuur . . .	3.28	13.1	14.9	14.9	14.9
Barnsteenzuur .	1.98	8.4	—	—	—6.9
Totaal . .		95.8 %	89.0	86.1	99.0

H₂CO₂ = 1,15.

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 1,13.

groote hoeveelheden waterstof en koolzuur, die gevormd worden, opvallen. *De waterstof is hier dus geheel afkomstig uit het als tussenproduct optredende mierenzuur.*

Dat in de hierboven genoemde drie gistproeven de vorming van barnsteenzuur door een C₄-C₂ splitsing van het glucose-molecuul verklaard kan worden, behoeft in het licht van het reeds medegedeelde geen nader betoog.

II. Glucosevergistingen door „rustende” colibacteriën in fosphaatbuffer-suspensie bereid, door gedeeltelijk anaeroob kweken in vloeibare caseïne pepton.

Van de stammen 1452 en „Stickland” werden vóór-culturen in de caseïnepepton geënt. Na 24 uur werden met de vóórculturen 16 flesschen van 1000 ccm inhoud, ieder 500 ccm caseïnepepton bevattende, geënt. Na pl.m. 20 uur werd van deze cultuur op de reeds eerder genoemde wijze een suspensie bereid en

hiermede de glucosevergisting uitgevoerd. De resultaten van deze proeven zijn in de tabellen 4 en 5 samengevat.

TABEL 4.

Stam: Coli 1452.

Aard der gisting: Rustende colisuspensie in fosphaatbuffer $P_H = 6,2$.

Wijze van kweken: Gedeeltelijk anaeroob in vloeibare caseïne pepton.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 0.32 gram barnsteenzuur is 0.49 gram glucose en 22 grammol acetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose . .	4.00				
Teruggevonden glucose . .	2.38				
Vergiste glucose	1.62	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C $\begin{smallmatrix} \text{=O} \\ \text{H} \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	0.010	—	41	—	—
Koolzuur . . .	0.30	13	—	54	—
Azijszuur . . .	0.17	10	—22	—	22
Mierenzuur . .	0.014	0.6	2.4	2.4	—
Aethylalcohol .	0.18	14	31	—	31
Melkzuur . . .	0.59	37	52	52	52
Barnsteenzuur .	0.32	20	—	—	—22
Totaal . .		94.6 %	104.4	109.5	82

H₂CO₂ = 0,75.

Azijszuur/Aethylalcohol = 0,72.

Hieruit valt het volgende af te leiden. De stam 1452 vergist in suspensie, dus als „rustende” coli, de glucose op nagenoeg dezelfde wijze als het geval is, wanneer groeiende bacteriën gebruikt worden en krijgt aan het medium toegevoegd is om de gevormde zuren te binden. (Zie tabel 1). Hoogstens wordt hier iets meer het „pyrodruivenzuurschema” gevolgd. *Doch ook onder deze omstandigheden vindt de ontwikkelde waterstof in hoofdzaak haar oorsprong in het tijdens de glucosevergisting optredende mierenzuur en slechts in geringe mate in de ontleding via het pyrodruivenzuur.*

Anders daarentegen gedraagt zich de „Stickland”-stam. Hier overheerscht blijkbaar het „pyrodruivenzuurschema” daar

TABEL 5.

Stam: Coli „Stickland”.

Aard der gisting: Rustende colisuspensie in fosphaatbuffer $P_H = 6,2$.

Wijze van kweken: Gedeeltelijk anaeroob in vloeibare caseïne pepton.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 0.15 gram barnsteenzuur is 0.23 gram glucose en 9.8 grammol aceetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose . .	4.00				
Teruggevonden glucose . .	2.62				
Vergiste glucose	1.38	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C $\begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	0.0039	—	16	—	—
Koolzuur . . .	0.29	14	—	51	—
Aziijnzuur . . .	0.056	4	—7.2	—	7.2
Mierenzuur . .	0.0053	2.2	0.9	0.9	—
Aethylalcohol .	0.15	14	25	—	25
Melkzuur . . .	0.74	51	64	64	64
Barnsteenzuur .	0.15	10	—	—	—9.8
Totaal . .		93.2 %	98.1	115.9	86.4

H₂CO₂ = 0,29.

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 0,29.

de quotienten H₂/CO₂ en aziijnzuur/aethylalcohol, opvallend mooi aan elkaar gelijk, zeer aanzienlijk van 1 afwijken. Daar er echter zéér weinig mierenzuur in het substraat achtergebleven is (vgl. de hierna te behandelen glucose-vergistingen met aeroob gekweekte culturen, tabel 7 en 8), ligt het voor de hand om aan te nemen, dat ook bij deze glucosevergisting *een deel van de* (zoo al niet *alle*) *als gas vrijgekomen waterstof haar ontstaan aan het tusschenproduct mierenzuur te danken heeft.*

III. Glucosevergisting door „rustende” colibacteriën in fosphaatbuffer. Suspensie bereid door gedeeltelijk anaeroob kweken in caseïne pepton + 1% glucose.

In verband met de mogelijkheid dat de colibacteriën de glucose op andere wijze zouden kunnen vergisten, indien zij van te voren hieraan „gewend” zouden zijn, werd de stam 1452 ge-

durende twee weken dagelijks overgezet op schuingestolde caseïne-pepton-agar, waaraan $\frac{1}{2}\%$ glucose toegevoegd was. Hiervan werd via de gebruikelijke vóórcultuur in vloeibare caseïne pepton + 1% glucose geënt en met de uit deze kweek resulterende suspensie een glucosevergisting uitgevoerd, waarvan de resultaten in tabel 6 te vinden zijn.

TABEL 6.

Stam: Coli 1452.

Aard der gisting: Rustende colisuspensie in fosphaatbuffer $P_H = 6,2$.

Wijze van kweken: Stam voor de proef 14 maal dagelijks overgezet op caseïne-pepton-agar + 0,5% glucose. Daarna suspensie bereid door gedeeltelijk anaeroob kweken in vloeibare caseïne-pepton + 1% glucose.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige kool- stof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose.		
			H_2	CO_2	$CH_3C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{smallmatrix}$
Toegevoegde glucose . .	4.00				
Teruggevonden glucose . .	2.65				
Vergiste glucose	1.35	100			
Waterstof . . .	0.0086	—	29	—	—
Koolzuur . . .	0.022	11	—	34	—
Aziijnzuur . . .	0.082	6.1	—9.3	—	9.3
Mierenzuur . .	0.0025	0.1	0.4	0.4	—
Aethylalcohol .	0.093	9.0	13	—	13
Melkzuur . . .	1.0	75	74	74	74
Barnsteenzuur .	—	—	—	—	—
Totaal . .		101.3 %	107.1	108.4	96.3

$H_2CO_2 = 0,84$.

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 0,70.

P_H der uitgiste vloeistof = 4,41.

Vergelijkt men deze cijfers met die van tabel 4, waarin de overeenkomstige glucosevergisting met den zelfden, *niet* aan glucose „gewenden” stam vermeld werd, dan blijkt als eenige verschil naar voren te komen de afwezigheid van barnsteenzuur onder de vergistingsproducten, terwijl relatief ongeveer de

dubbele hoeveelheid melkzuur gevormd werd. In overeenstemming hiermede werd van de andere vergistingsproducten een relatief kleinere hoeveelheid gevonden.

De H_2/CO_2 en azijnzuur/alcohol-quotienten zijn echter in beide gevallen nagenoeg gelijk, zoodat ook hier weer met groote waarschijnlijkheid aangenomen mag worden, *dat de waterstof via het mierenzuur als gas vrij komt.*

IV. Glucosevergisting door rustende colibacteriën in fosphaatbuffer. Suspensie bereid door geheel aeroob kweken op caseïne-pepton-agar.

Voor de bereiding van het benodigde bacterie-materiaal werden Roux-flesschen gebruikt, waarin zich een laag gestolde caseïne-pepton-agar (4% agar) bevond. Deze werden geënt met een vloeibare kweek in caseïne pepton. De met deze suspensie uitgevoerde glucosevergisting is in tabel 7 weergegeven.

Hierbij valt direct op, dat de waterstofvorming geheel achterwege gebleven is, zulks in tegenstelling met de kwalitatieve proeven, welke in de eerste mededeeling beschreven werden (zie in de desbetreffende tabel de proeven 9 en 13, stam 1452). In hoeverre de ongetwijfeld verschillende omstandigheden waaronder deze proeven genomen werden, hier een rol spelen, dient in het midden gelaten te worden. Er zij slechts op gewezen, dat in de vroeger vermelde proevenreeks de waterstofvorming uit glucose onder deze omstandigheden geenszins regel was (zie proef 12, waarbij de bacteriën gekweekt werden op caseïne-pepton-agar puriss. Grübler).

Tegenover het ontbreken van waterstof onder de ontledingsproducten van glucose, valt echter een relatief grootere hoeveelheid mierenzuur en een kleine hoeveelheid koolzuur op te merken. De vraag rijst nu vanzelf waar dit koolzuur vandaan komt. Gezien het feit dat deze colistam 1452 onder alle omstandigheden grootendeels het „mierenzuurschema”, doch tevens steeds voor een klein gedeelte het „pyrodruivenzuurschema” volgt, ligt het dus voor de hand, de koolzuurvorming in het onderhavige geval te zoeken in de glucoseontleding volgens den laatstgenoemden weg. Indien deze veronderstelling juist is, dan moet dus de bij de ontleding van methylglyoxaalhydraat gevormde waterstof geheel gebruikt worden om aceetaldehyde tot alcohol

TABEL 7.

Stam: Coli 1452.

Aard der gisting: Rustende colisuspensie in fosfaatbuffer $P_H = 6.2$.

Wijze van kweken: Geheel aeroob op caseïne-pepton-agar.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 0.058 gram barnsteenzuur is 0.088 gram glucose en 5.6 grammol acetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose . .	4.00				
Teruggevonden glucose . .	3.12				
Vergiste glucose	0.88	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C(=O)H
Waterstof . . .	—	—	—	—	—
Koolzuur . . .	0.047	3,6	—	12	—
Aziijnzuur . . .	0.067	7,8	—13	—	13
Mierenzuur . .	0.19	14	47	47	—
Aethylalcohol .	0.10	18	25	—	25
Melkzuur . . .	0.49	55	61	61	61
Barnsteenzuur .	0.058	6,2	—	—	—5.6
Totaal . .		104,6 %	120	120	93,4

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 0,49.

Surplus aan Aethylalc. = $\frac{0.10}{46} - \frac{0.067}{60} = 0,00217 - 0,00110 = 0,00107$ gramm.

Koolzuur geproduceerd $\frac{0,047}{44} = 0,00107$ grammol.

V.P. — reactie negatief. P_H der uitgiste vloeistof = 4,75.

te reduceeren. Als gevolg hiervan moeten dan de hoeveelheden gevormd koolzuur en overmaat alcohol (d.w.z. alcohol minus aziijnzuur), beide in grammolen uitgedrukt, aan elkaar gelijk zijn. Dit blijkt inderdaad zoo te zijn. Dat hier de quantiteiten zoo opvallend aan elkaar gelijk zijn, is natuurlijk aan een toevallig zeer gunstig analyseresultaat toe te schrijven.

Dat de hoeveelheden H₂ en CO₂, voorkomende in de waterstof-koolzuur-acetaldehydebalans nogal van 100 afwijken, zal vermoedelijk door een te hoog uitvallen der mierenzuurbepaling veroorzaakt worden. Dat de vergistingsbalans, resp. de hieraan ten grondslag liggende analyses, gezien de zeer geringe hoeveelheid vergiste glucose, geen groote nauwkeurigheid bezitten, behoeft geen nadere uiteenzetting.

Dat er onder deze omstandigheden zoo weinig glucose vergist wordt, vindt geredelijk zijn verklaring in het feit, dat het hierbij optredende mierenzuur niet verder ontleed wordt, waardoor dus de P_H sneller op de fatale lage waarde daalt, dan anders het geval is, hetgeen weer tengevolge moet hebben, dat er in totaal minder glucose vergist wordt.

V. Glucosevergisting door rustende colibacteriën in fosphaatbuffer. Suspensie bereid door geheel aeroob kweken op caseïne pepton + ½% natriumformiaat.

Ten slotte werd nog nagegaan, in hoeverre een voorafgaande „gewenning” aan mierenzuur onder aerobe omstandigheden, de hieruit ontstane bacteriesuspensie wel in staat zou stellen, glucose onder waterstofvorming te ontleden. Stam 1452 werd daartoe 14 × dagelijks overgezet op caseïne-pepton-agar + ½% Natriumformiaat en via een passende voorcultuur geënt op Roux-flesschen met caseïne-pepton-agar + ½% Natriumformiaat. De met deze suspensie verrichte glucosevergisting is in tabel 8 weergegeven.

Hieruit blijkt, dat het doel via de „gewenning” niet bereikt werd. Deze gistproef komt principieel met de vorige overeen. Ook hier heeft de ontleding grootendeels via het „mierenzuurschema” plaats gevonden en slechts voor een klein gedeelte via het „pyrodruivenzuurschema”. Hierbij is de vrijkomende waterstof vermoedelijk weer geheel gebruikt voor een reductie van aceetaldehyde tot aethylalcohol, hetgeen blijkt uit de waarden van het alcoholsurplus en de gevormde hoeveelheid koolzuur, welke, uitgedrukt in grammoleculen, ongeveer aan elkaar gelijk zijn. Dat de overeenstemming in dit geval niet zoo fraai is, als bij de vorige gistproef het geval was, behoeft geen nadere explicatie. Ook de geringe glucosevergisting vindt in de reeds eerder genoemde oorzaak haar verklaring.

Overzien we nu het geheel van de medegedeelde gistproeven, dan blijken deze in quantitatief opzicht een bevestiging te zijn van de in de eerste verhandeling medegedeelde proeven, welke slechts een kwalitatief karakter droegen. Aan de daar ter plaatse geformuleerde conclusies behoeft dan ook weinig toegevoegd te worden. Samenvattend kan betreffende de ontleding van glucose andere anaerobe omstandigheden door colibacteriën,

TABEL 8.

Stam: Coli 1452.

Aard der gisting: Rustende colisuspensie in fosphaatbuffer $P_H = 6,2$.

Wijze van kweken: Stam vóór de proef 14 maal dagelijks overgezet op caseïne-pepton-agar + 0,5% Na-formiaat. Daarna suspensie bereid door geheel aeroob kweken op caseïne-pepton + 0,5% Na-formiaat.

Producten	Gram	Procenten der in de producten aanwezige koolstof, berekend op C van de vergiste glucose	Grammol per 50 grammol vergiste glucose. Voor 0.13 gram barnsteenzuur is 0.20 gram glucose en 16 grammol aceetaldehyde afgetrokken.		
Toegevoegde glucose . .	4.00				
Teruggevonden glucose . .	3.18				
Vergiste glucose	0.82	100	H ₂	CO ₂	CH ₃ C $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{smallmatrix}$
Waterstof . . .	—	—	—	—	—
Koolzuur . . .	0.027	2.2	—	8.5	—
Aziijnzuur . . .	0.080	9.8	—20	—	20
Mierenzuur . .	0.19	15	59	59	—
Aethylalcohol .	0.080	13	26	—	26
Melkzuur . . .	0.41	50	66	66	66
Barnsteenzuur .	0.13	16	—	—	—16
Totaal . .		106 %	131	131.5	96

Aziijnzuur/Aethylalcohol = 0,75.

Surplus aan aethylalc. = $\frac{0,080}{46} - \frac{0,080}{50} = 0,00174 - 0,00133 = 0,0041$ gramm.

Koolzuur geproduceerd = $\frac{0,027}{44} = 0,0061$ grammol.

P_H der uitgiste vloeistof = 4,89.

gezegd worden, dat deze ontleding in de meerderheid van de gevallen plaats vindt via het „mierenzuurschema” en *de gasvormig ontwijkende waterstof voor het grootste deel gevormd wordt door ontleding van het intermediair gevormde mierenzuur*. Slechts in enkele gevallen kan de ontleding van het glucosemolecuul via het „pyrodruivenzuurschema” in sterkere mate op den voorgrond treden. Een en ander geldt zoowel voor de glucosevergistingen met levende, zich vermeerderende colibacteriën, als voor die gevallen, waarbij de glucose in fosphaatbuffer bij $P_H = 6,2$ door suspensies van „rustende” colibacteriën

vergist wordt. Het geheel van de waargenomen verschijnselen is dus volkomen in overeenstemming met de voorstellingwijze welke door *Kluyver*, *Scheffer* e.a. van de glucosevergisting door de leden der coli-typhus-dysenteriegroep gegeven is.

Samenvatting.

1. In aansluiting aan de reeds eerder medegedeelde proeven over de vorming van waterstof en koolzuur bij de vergisting van glucose door „rustende” colibacteriën, werden in deze mededeeling gistproeven beschreven, waarbij de glucose onder anaerobe omstandigheden door levende, zich vermeerderende, zoowel als door suspensies van „rustende” colibacteriën vergist werd.

2. Hierbij bleek, dat in de meerderheid van de gevallen de glucose in hoofdzaak via het z.g. „mierenzuurschema” ontleed wordt. Dit heeft tot gevolg, dat de optredende gasvormige waterstof in deze gevallen gevormd wordt door ontleding van intermediair gevormd mierenzuur in aequivalente hoeveelheden waterstof en koolzuur.

3. Slechts in sommige gevallen kan de glucose in sterkere mate via het z.g. „pyrodruivenzuurschema” ontleed worden. Dit uit zich dan in het feit, dat de quotienten H_2/CO_2 en azijnzuur/aethylalcohol, hoewel onderling gelijk, sterk van 1 afwijken.

4. Het geheel der waargenomen feiten bleek volkomen in overeenstemming te zijn met de voorstellingswijze van de glucosevergisting, zooals deze door *Kluyver*, *Scheffer* e.a. gegeven is.

Tenslotte zij een woord van dank gericht tot Dr. A. W. Pot, die mij een zeer gewaardeerde medewerking verleende bij de uitvoering van dit onderzoek.

LITERATUUR.

- (1) *A. Tasman* en *A. W. Pot*: *Leeuwenhoek* 2, 130 (1935).
Biochem. J. 29, 1749 (1935).
- (2) *L. H. Stickland*: *Biochem. J.* 23, 1187 (1929).

- M. Stephenson* en *L. H. Stickland*: Biochem. J. 25, 205 (1931) 26, 712 (1932), 27, 1528 (1933).
- (3) *J. Yudkin*: Biochem. J. 26, 1859 (1932).
- (4) *A. J. Kluyver*: The Chemical Activities of Microorganisms, London, 1931; *Ergebn. Enzymf.* 4, 230 (1935).
- (5) *M. A. Scheffer*: De suikervergisting door bacteriën der Coligroep; Diss. Delft 1928.
- (6) *Cole* en *Onslow*: A system of Bacteriology IX, 59 en 60 (1931).
- (7) *A. Tasman* en *A. W. Pot*: Biochem. Z. 270, 349 (1934); *Leeuwenhoek*, 1, 88, 179 (1934).
- (8) *A. Tasman*: Chem. Weekblad 29, 694 (1932).
-

Over Staphylotoxine en -toxoid

DOOR

Dr. W. Aeg. TIMMERMAN,

Directeur.

Enkele jaren geleden deelde ik in dit tijdschrift een en ander mede over staphylococcentoxine en -antitoxine (1). Ik kon onder meer een werkwijze aangeven, volgens welke het mogelijk was een voldoende sterk staphylotoxine te bereiden. Tevens werden enkele eigenschappen van dit toxine besproken, terwijl ook de aandacht gevestigd werd op de mogelijkheid een antitoxisch serum te bereiden, waarvan toepassing in de praktijk overweging verdiende.

De onderzoekingen zijn intusschen voortgezet en hebben enkele nieuwe feiten aan het licht gebracht, die, naar het mij voorkomt, belangrijk genoeg zijn hier te worden besproken.

1. *Toxine*. De bereidingsmethode volgens *Parish* en *Clark*, die ik indertijd, zij het eenigermate gewijzigd, heb aangebevolen, volg ik thans nog. Wel zijn in de literatuur enkele andere werkwijzen opgegeven. Als voornaamste hiervan noem ik die van *Dolman* (2) en van *Ramon* (3). De eerste tracht door vermijding van verhitte en eindfiltratie de sterkte van het toxine op te voeren; de tweede gebruikt de diphtheriebouillon van *Martin* als voedingsbodem. Ik heb beide methoden beproefd, maar verkreeg met Dolman's bodem in den regel iets zwakkere toxines, met die van Ramon veel zwakkere. Ik ben daarom bij de oorspronkelijke aangegeven werkwijze gebleven.

De sterkte van het toxine wordt gemeten aan de haemolytische en de necrotiseerende werking en bovendien aan de acute doodende kracht bij intraveneuse inspuiting van proefdieren. De vraag, of deze drie eigenschappen op hetzelfde toxische principe

berusten, wordt thans vrij algemeen in den zin van identiteit beantwoord. Er zijn althans geen feiten aan het licht gekomen, die met deze opvatting in strijd zijn. Wel is kort geleden een hiermede samenhangend vraagstuk aanhangig gemaakt door *Glenny* (4), die meende het bestaan van twee toxines (α en β) te moeten aannemen, onder andere op grond van het feit, dat de haemolytische werking ten opzichte van konijne- en schape-erythrocyten niet bij elk toxine parallel liepen. Voor zoover mij bekend, zijn deze onderzoekingen nog niet bevestigd. Ik zelf heb het verschijnsel bij de toxines, die ik tot mijn beschikking heb, nog niet kunnen vaststellen.

Wat de sterkte van het tegenwoordig bereide toxine betreft moge worden opgemerkt, dat de minimale haemolytische dosis voor 1 cm³ van een twee-procentige suspensie van konijnecellen in den regel ligt tusschen 0,0005 en 0,001 cm³. De dosis necroticans minima bedraagt in de caviahuid 0,001 à 0,0025 cm³, de acuut doodende werking bij de muis ongeveer 0,01 cm³, bij het konijn 0,1 cm³ per kilogram lichaamsgewicht, de beide laatste na intraveneuse inspuiting. Ofschoon het toxine dus wat sterker is dan het eenige jaren geleden bereide, is de toxiciteit toch zeker niet zeer hoog te noemen. Vooral wanneer wij ons de uiterst kleine hoeveelheden tetanus- en diphtherietoxine, voldoende om onze proefdieren te doden, voor den geest roepen, lijkt dit staphylotoxine wel zeer zwak. Dit is inderdaad juist. De toxiciteit zelf is echter niet in de eerste plaats van belang. Wanneer het toxine slechts een goede antigene werking ontvouwt en bovendien in staat is zich in voldoende mate met het specifieke antitoxine te binden, is het zeer goed bruikbaar. Deze beide eigenschappen komen in het navolgende ter sprake.

2. *Toxoïd*. De vergiftige werking van het toxine staat de practische toepassing van dit praeparaat in den weg. Wel is het door *Greenbaum* en *Harkins* (5), en door *Weise* (6) niet zonder succes bij patiënten toegepast. Maar deze methode heeft, door het er aan verbonden gevaar, geen ingang gevonden.

De omzetting van toxine in een niet-giftig praeparaat met behoud der antigene eigenschappen gelukte het eerst aan *Burnet* (7), daarna aan *Parish* en *Clark* (8), mijzelf (l.c.) en anderen. Op gelijksoortige wijze als *Ramon* het diphtherietoxine in een niet giftig anatoxine omzette, behandelde *Burnet* het staphylo-

toxine, nl. door plaatsing bij 37° na toevoeging van 4‰ handelsformaline. Hij noemde het aldus verkregen praeparaat staphylococcen-toxoid ¹⁾).

Diphtherietoxine moet in den regel 4 weken bij 39° C worden geplaatst, voor het zijn toxische werking op proefdieren geheel heeft verloren. Bij staphylotoxine verloopt het proces wat sneller, ook bij de iets lagere temperatuur van 37° C. In de literatuur wordt opgegeven, dat 14 dagen noodig zijn. Onderzoekingen, welke thans alhier in gang zijn, doen de vraag rijzen of een belangrijk kortere periode niet reeds voldoende is.

Teneinde de ongiftigheid vast te stellen, wordt gebruik gemaakt van de bekende eigenschappen van het toxine. In vitro wordt nagegaan of de haemolytische werking verdwenen is. Als eisch wordt gesteld, dat 1 cm^3 van een 2% suspensie van konijne-erythrocyten na een verblijf van 1 uur bij 37° C, gevolgd door 1 uur kamertemperatuur, geen spoor van haemolyse mag veroorzaken. Hier moge er aan worden herinnerd, dat het toxine zelf, onder geheel gelijke omstandigheden in staat is in een hoeveelheid van minder dan 1 mm^3 , volledige haemolyse te verwekken.

Ook de necrotiseerende werking bij inspuiting in de dierenhuid moet geheel verdwenen zijn. Deze wordt onderzocht door intracutane injectie bij het konijn. Dit dier wordt boven de cavia verkozen, omdat bij de laatste belangrijk grotere hoeveelheden moeten worden ingespoten, om duidelijke necrose te verwekken.

Tenslotte wordt nagegaan in hoeverre het praeparaat ook bij intraveneuse inspuiting bij het konijn geheel onschadelijk is. Als eisch wordt gesteld, dat 3 konijnen van ongeveer 2000 gr. lichaamsgewicht, ieder intraveneus ingespoten met $2,5\text{ cm}^3$ per 1000 gr. gewicht, niet aan de gevolgen der injecties mogen sterven.

Deze eischen van onschadelijkheid zijn streng. Zij geven echter een groote waarborg, dat bij eventueele toepassing als

¹⁾ Ik zal dezen naam blijven gebruiken. Het feit, dat een op overeenkomstige wijze uit diphtherie-toxine bereid praeparaat met den naam anatoxine wordt aangeduid (een naam, die overigens reeds veel eerder voor een andere stof was gekozen), is geen reden nu ook van staphylococcen-anatoxine te spreken. Bovendien wordt thans algemeen het woord anatoxine aan het begrip diphtherie verbonden, hetgeen gemakkelijk tot verwarring aanleiding zou kunnen geven.

geneesmiddel bij den mensch, geen ongewenschte gevolgen zullen optreden en zijn dan ook door den Nederlandschen Wetgever voorgeschreven voor alle in den handel komende entstoffen uit staphylococcengif bereid (9).

3. *Standaardisatie.* In mijn bovenaangehaalde mededeeling bepaalde ik het gehalte aan antistoffen in serum, door na te gaan hoeveel haemolytische doses van een zeker toxine door een bepaalde hoeveelheid van het te onderzoeken immuunserum konden worden geneutraliseerd. Dit was toen de eenige mogelijkheid. Echter een zeer onzekere, omdat op verschillende tijdstippen uitgevoerde serumtitraties òf in vergelijking met verschillende toxines òf met eenzelfde, doch intusschen ouder geworden toxine moesten worden verricht. En wij hadden geen middel om de verschillende toxines onderling te vergelijken. Serumtitraties zijn slechts dan behoorlijk vergelijkbaar, indien zij alle steeds worden uitgevoerd naast bepalingen van het gebruikte toxine met een standaardserum, waarvan de titer bekend is en waarvan met recht verwacht kan worden, dat het niet verandert in zijn gehalte aan antistoffen. Teneinde aan deze moeilijkheid te ontkomen, hadden de meeste laboratoria een door henzelf bereid serum als standaardserum voor eigen gebruik aangenomen. Deze individueele standaardsera konden evenwel onderling weer niet worden vergeleken, en hetzelfde gold natuurlijk voor de uitkomsten der onderzoekingen.

In dezen toestand is thans verandering gekomen, omdat wij, als gevolg van de bemoeiingen van den Volkenbond, tegenwoordig de beschikking hebben over een standaardserum, waarvan de waarde wordt uitgedrukt in een aantal — evenzoo door den Volkenbond vastgestelde — immuniteitseenheden. Dit serum is bereid door *Hartley* en zeer grondig in een aantal laboratoria onderzocht, alvorens het als standaard werd aangenomen (10). De titratie van het staphylococcen-antitoxine is hiermede in dezelfde banen geleid als die van diphtherie- en tetanusserum en derhalve zeer veel nauwkeuriger geworden, terwijl deze methode natuurlijk ook de onderlinge vergelijking der proefnemingen in verschillende laboratoria mogelijk maakt.

Als practische toepassing van dit standaardserum moge in de eerste plaats genoemd worden de titratie van de antitoxische staphylococcensera. De eenheid van antitoxine is zoodanig ge-

kozen, dat het aantal eenheden, dat men door immunisatie van paarden kan bereiken, ongeveer in dezelfde grootte-orde valt als de bij diphtheriesera verkregen getallen.

De juiste wijze van titreeren verloopt aldus, dat men in een voorproef van een zeker toxine de hoeveelheid bepaalt, die na menging met de antitoxine-eenheid van het standaardserum nog juist geen haemolyse geeft in 1 cm³ van een 2% suspensie gewassen konijne-erythrocyten.

Is de hiervoor benoodigde hoeveelheid toxine vastgesteld, dan wordt deze in de hoofdproef met dalende hoeveelheden van het te onderzoeken serum gemengd en de geringste hoeveelheid serum gezocht, die geen haemolyse geeft.

Het volgende protocol, waarin de controles zijn weggelaten, moge een en ander verduidelijken (tabel 1).

TABEL I.
Titratie van een staphylococcen-serum.

Voorproef.						
Toxine onverdund	0.14	0.16	0.18	0.20	0.22	0.24
1 AE St. Ser. in 0,5 cm ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Physiol. NaCl	0.36	0.34	0.32	0.30	0.28	0.26
30' laten staan bij kamertemperatuur.						
Rooide bl. cellen 2%	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 uur bij 37°, daarna 1 uur bij kamertemperatuur.						
Haemolyse	0	0	0	++	+++	c
Testdosis van het toxine 0.18 cm ³ .						
Hoofdproef.						
Toxine onverdund	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
0.5 cm ³ . Ser. verdunning	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180	1/200
Physiol. NaCl	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
30' kamertemperatuur.						
Rooide bl. cellen 2%	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 uur bij 37°, daarna 1 uur kamertemperatuur.						
Haemolyse	0	0	0	+	++	+++
Titer van het serum 280 AE.						

Uit de voorproef in bovenstaande tabel 1 volgt, dat 1 AE in staat is de haemolytische werking van 0,18 cm³ van het ge-

bruikte toxine te neutraliseeren. Uit de hoofdproef volgt verder, dat 0,5 cm³ van de verdunning $\frac{1}{140}$ van het te onderzoeken serum hiertoe ook in staat is. Hierin moet zich dus ook 1 AE bevinden. De titer van het serum bedraagt dus 280 AE per cm³.

Op analoge wijze kunnen wij ook sera met een laag of zeer laag gehalte aan antistoffen titreeren. We moeten dan in voorproeven de hoeveelheden toxine vaststellen, die door 0,1 en 0,01 AE worden geneutraliseerd. Men bedenke, dat hier niet de wet der multiple proporties geldt. In het bovenstaande neutraliseerde 1 AE 0,18 cm³ toxine; 0,1 en 0,01 AE bleken 0,020 en 0,0026 cm³ toxine te kunnen neutraliseeren. Dit verschijnsel, waarop thans niet nader zal worden ingegaan, ontmoeten wij bij de titratie van diphtherie ook.

4. *Antigene werking van het toxoïd.* Deze wordt uiteraard vastgesteld op proefdieren. Men kan bij de bepaling der antigene werking van entstoffen van verschillende standpunten uitgaan. Het mooiste ware, indien wij ook deze werking in een maat of getal zouden kunnen uitdrukken, evenals dit het geval is met de eenheden van antitoxine in het serum. Daarvoor is dan echter ook een standaardantigeen noodig, waarmee wij het te onderzoeken praeparaat kunnen vergelijken. Met name bij de waardebepaling der verschillende entstoffen ter voorbehoeding tegen diphtherie is dit vraagstuk van alle kanten onderzocht. Naar het mij voorkomt, is het echter niet tot tevredenheid opgelost. Wel wordt tegenwoordig van Duitsche zijde een standaard „Diphtherie-Impstoff” voorgesteld, maar het practisch nut hiervan lijkt mij niet groot. Immers men moet steeds met de te onderzoeken entstof, ook de standaard onderzoeken. Dit is reeds daarom onvermijdelijk, omdat de immuniseerbaarheid der proefdieren in verschillende jaargetijden zoo buitengewoon sterk wisselt. Men kan dus nooit afgaan op de resultaten van een vorig onderzoek van het standaardpraeparaat. Maar ook als men steeds de beide praeparaten vergelijkt, stuit men op groote moeilijkheden. De individueele verschillen der proefdieren zijn uitermate groot. Wij kunnen trachten deze zoo klein mogelijk te maken, door uit te gaan van een zelfde „stock”, dus van dieren, die men kent en zelf heeft gekweekt. Maar ook dan nog moet men elke proef met eenige honderden dieren uitvoeren, om althans eenigermate vergelijkbare resultaten te verkrijgen. Dit

is practisch onuitvoerbaar, maar al ware dit niet zoo, dan geloof ik toch, dat aan de uitkomsten niet te veel waarde mag worden gehecht, althans niet zooveel, dat wij de antigene waarde van het onderzochte praeparaat in een getal zouden kunnen uitdrukken.

Dit alles geldt naar mijn meening *mutatis mutandis* ook voor het staphylococcen-toxoid. Wij hebben ons daarom op het standpunt gesteld, dat het beter is het bestaan van een antigene werking met zekerheid aan te toonen, dan te trachten een meting uit te voeren, die niet meer dan een schijnzekerheid kan geven. Daarom bepalen wij de antigene werking van een staphylococcentoxoid door een aantal van 9 caviae twee onderhuidsche inspuitingen toe te dienen van 1 en 2 cm³, met een tusschenruimte van 3 weken. Twee weken na de laatste injectie wordt het serum van de dieren onderzocht op het gehalte aan antistoffen. Wij zijn tevreden over de sterkte der antigene werking, wanneer of het bloedserum van minstens 6 dieren per cm³ tenminste $\frac{1}{2}$ antitoxische eenheid bevat, of wanneer minstens 3 dieren per cm³ tenminste 1 AE hebben. Het alternatief is gesteld, omdat het zeer goed mogelijk is, dat er onder de caviae verscheidene voorkomen, die slechte antitoxinevormers zijn. Deze minimum-eisch van antigene werking van staphylococcen-toxoid is in Nederland wettelijk vastgelegd. Het is echter niet onwaarschijnlijk, dat deze bepaling te eeniger tijd zal moeten gewijzigd. Immers stilzwijgend is voorondersteld, dat caviae geen — zogenaamd — normaal antitoxine in hun bloed hebben. Het is mij echter thans gebleken, dat deze opvatting niet juist is. Ik heb van 88 gezonde caviae het gehalte bepaald (tabel II).

TABEL II.

Antitoxine-gehalte v. h. bloedserum van 88 gezonde caviae.

Per cm ³ . serum.			
< 00.5 AE	0.1 AE	0.25 AE	0.50 AE
88	1	3	1

Het blijkt dus, dat er eenige caviae in deze groep zijn, die een gemakkelijk meetbare hoeveelheid antitoxine in het bloed hebben. Ofschoon het aantal niet groot is, evenmin als de hoeveelheid antitoxine per cm³, vormen zij toch zeker een bron van

fouten, temeer omdat de antitoxine-dragers waarschijnlijk sterk reageeren op het ingespoten toxoïd. Hierdoor levert het onderzoek een geflatteerd beeld op. Teneinde dit te voorkomen moeten wij er zeker van zijn, dat de proefdieren vrij van antitoxine zijn. Nu is een dergelijk onderzoek bij caviae, waarbij hartpunctie moet worden verricht, natuurlijk zeer goed mogelijk, maar voor de praktijk toch minder geschikt. In de eerste plaats, omdat wij in den regel slechts weinig bloed van caviae kunnen afnemen, maar ook omdat er gevaar voor sterfte bestaat, dus onnoodig verlies. Wij doen daarom beter de antigene werking op andere proefdieren, i.c. konijnen te onderzoeken. Ook deze dieren hebben soms antitoxine in het bloedserum (tabel III).

TABEL III.

Antitoxine-gehalte v. h. bloedserum van 28 gezonde konijnen.

Per cm ³ serum.					
< 0.05 AE	0.05 AE	0.1 AE	0.5 AE	1 AE	2 AE
21	2	2	1	1	1

Het schijnt dus, dat bij konijnen het aantal antitoxine-dragers grooter is dan bij caviae: bloedonderzoek van tevoren is dus in elk geval geboden.

De oorzaak van dit gehalte aan „normale” antitoxines is niet met zekerheid te zeggen, mogelijk wordt het veroorzaakt door beet- of krabwonden, die onder staphylococcen-infectie genezen.

In het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid worden toxoïden bereid, die gemakkelijk aan de bovengenoemde eischen van antigene werking voldoen. Onderzoek van het praparaat W. 46. II bijv. had tot resultaat, dat van 9 caviae $1 < 0.1 - 2 \times 0.1 - 2 \times 1 - 2 \times 2 - 1 \times 5$ en 1×10 AE per cm³ serum bleken te bevatten.

Was hiermede de antigene werking op proefdieren bewezen, de vraag rees hoe het zich bij menschen zou gedragen. Het resultaat bij 3 personen blijkt uit tabel IV.

Ofschoon de stijging bij den eenen mensch sterker is dan bij den anderen, blijkt dit toxoid toch in staat bij alle drie proefpersonen het antitoxinegehalte in het bloed aanmerkelijk te verhoogen.

TABEL IV.

Antigene werking van Toxoïd W. 46. II op 3 menschen.

	Antitoxine-gehalte per cm ³ . serum.	
	Voor de immunisatie.	Na de immunisatie.
T.	0.5 AE	8 AE
S.	1.5 AE	13 AE
Sch.	0.5 AE	1.5 AE

5. *Immunitet.* In het bovenstaande is stilzwijgend voorondersteld, dat de immunitet tegen staphylococceninfecties van antitoxischen aard is. Immers, toeneming van het antitoxinegehalte van het bloed, gemeten aan de antihaemolytische werking, is slechts dan van waarde voor de verdediging van den mensch tegen de besmetting met staphylococcen, indien het toxine hierbij een belangrijke rol speelt. Bestaat er echter ook een antibacterieele immunitet? Dezelfde vraag is herhaaldelijk gesteld bij het vraagstuk der onvatbaarheid tegen diphtherie. Ofschoon van Fransche zijde nog steeds antidiphtherieserum wordt aanbevolen, waarin zich een antibacterieele component bevindt, hebben, naar mijn meening, talloze dierproeven aangetoond, dat de werking van een serum afhankelijk is van het aantal eenheden antitoxine, dat het bevat. In hoeverre het serum, als zoodanig, een aspecifiek werkende prikkel uitoefent, laat ik in het midden. Aan den anderen kant kunnen wij nooit bewijzen, dat de, giftige, van bacillen bevrijde, diphtheriebouillon geen afbraakproducten der bacteriën bevat, b.v. endotoxines, die in het paardenlichaam aanleiding geven tot het ontstaan van antistoffen, welke dus in ons therapeutisch serum terecht komen.

Ook bij het vraagstuk der immunitet tegen staphylococcen rijst deze vraag. En hierbij zijn kortgeleden proeven beschreven door *Forsmann* (11), die — zoo zij worden bevestigd — toch wel een eenigszins ander inzicht in het vraagstuk geven. *Forsmann* behandelde konijnen met gedooide staphylococcenculturen en kon in het serum duidelijke beschermende werking aantoonen, terwijl antihaemolysinen geheel afwezig waren. Dat wil dus zeggen, dat de beschermende werking onafhankelijk is van het antihaemolysine-gehalte.

Forsmann trekt hieruit de gevolgtrekking, dat de immuniteit tegen besmetting met staphylococcen niet afhankelijk is van een bekende antistof. Indien dit zoo was, zou onze geheele titratie van wèl-bekende antistoffen, als waardemeting voor de beschermende werking van sera en voor de immuniseerende werking van antigenen waardeloos zijn. Er zijn echter zeker waarnemingen, die tegen *Forsmann's* opvatting pleiten. Hiervan moge de onderstaande tabel een voorbeeld geven (tabel V).

TABEL V.
Verband tusschen Immuniteit en Antistofgehalte.

Konijn.	Titer.		Verloop.
		Bij alle dieren:	
380	2 AE	Intraveneuse injectie	† 16 dagen.
381	2.5 "	met 1 cm ³ . van een	blijft leven, is na 8 maanden gezond.
382	3 "	24 uur oude	blijft leven, is na 8 maanden gezond.
383	5 "	bouillon-cultuur	blijft leven, is na 8 maanden gezond.
385	0.05 "	van Staphylococcen.	† 2 dagen.
386	0.05 "		† 3 dagen.

Tabel V geeft het verloop weer van een proef, waarbij van 6 konijnen, alle met een antitoxine-gehalte van minder dan 0,05 AE per cm³, 4 dieren (no. 280, 381, 382, 383) door middel van 2 onderhuidsche injecties met een toxoïd, worden geïmmuniseerd. Het resultaat hiervan is, dat het antitoxine-gehalte stijgt tot 2, 2,5, 3 en 5 AE per cm³. Deze 4 dieren, en de beide niet behandelde controles (no. 385 en 386) worden intraveneus besmet met 1 cm³ van een 24 uur oude levende bouilloncultuur van staphylococcen. Uit de laatste kolom blijkt, dat de beide controles na 2 à 3 dagen sterven; het dier met 2 AE per cm³ sterft pas na 16 dagen, terwijl de 3 andere dieren, met hooger antitoxine-gehalte, na 8 maanden nog gezond zijn.

Dit voorbeeld toont duidelijk het parallelisme aan tusschen de onvatbaarheid van de proefdieren en het antitoxine-gehalte, hetwelk is gemeten aan de antihaemolytische werking.

Wil men nu aan de laatste — in het voetspoor van *Forsmann* — elke waarde te ontzeggen, dan moet men aannemen, dat in deze proef — één uit ettelijke — de ontwikkeling van de onbekende antistof, met die van de bekende antihaemolytische parallel is gegaan. Onmogelijk is dit natuurlijk geenszins. Of

het inderdaad zoo is, zullen verdere proefnemingen misschien kunnen uitmaken. Voorloopig meen ik te mogen zeggen, dat het antitoxine-gehalte, althans in mijn proeven, een graadmeter is voor de immuniteit, waarbij in het midden gelaten wordt, of het ook het wezen van de onvatbaarheid uitgemaakt.

Samenvatting.

Er wordt een beschrijving gegeven van de bereiding en de standaardisatie van staphylococce-toxoïd, zooals die door het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid geschieden.

Voorts worden, aan de hand van proeven, enkele opmerkingen gemaakt over het wezen van de immuniteit tegen besmetting met staphylococce.

LITERATUUR.

- (1) *Timmerman, W.* Aeg. Ned. Tijdschr. v. Hyg. Microbiol. en Serol. 1933. 7. 178.
- (2) *Dolman, C. E.* Canadian Public Health Journal, 1932, 125.
- (3) *Ramon, G. et al.* Presse Médicale, 1935 no. 57.
- (4) *Glenny, A. T. and Stevens, M. F.* Jl. Path. and Bact. 1935. 40. 201.
- (5) *Greenbaum, C. S. en Harkins, M. J.* Jl. Am. Med. Ass. 1928. 90. 1699.
- (6) *Weise, C. E.* Jl. Am. Med. Ass. 1930. 95. 324.
- (7) *Burnet, F. M.* Jl. Path. and Bact. 1930. 33. 1 en 1931. 34. 471 en 759.
- (8) *Parish, H. J. and Clark, W. H. M.* Jl. Path. and Bact. 1931. 34. 593 en 1932. 35. 251.
- (9) Beschikking Min. v. Sociale Zaken van 10 Sept. 1935 (Staatsblad no. 176).
- (10) *Hartley, P. and Smith, M. L.* Quarterly Bulletin of the Health Organisation of the League of Nations. Special Number 1935.
- (11) *Forsmann, J.* Acta Path. et Microb. Scand. 1935. 12. 536.

Kaasvergiftigingen

DOOR

Dr. W. H. F. C. MAJOEWSKIJ en Drs. J. P. A. TUENTER.

Inleiding.

Het is geen zeldzaamheid, dat aan de Keuringsdiensten van Waren klachten binnen komen over vergiftigingsverschijnselen, die door gebruik van kaas zouden zijn veroorzaakt. Waarschijnlijk is, dat het aantal gevallen veel grooter is, dan hetgeen ter officieele kennis wordt gebracht; dit vermoedelijk in verband met het feit, dat vrijwel steeds de symptomen der intoxicatie na 24 uur verdwenen plegen te zijn, en verder, doordat men dikwijls niet op het idee zal komen de oorzaak van de ontstane ziekte in ons nationale en gewaardeerde zuivelproduct te zoeken.

Het gevolg hiervan is, dat op dit gebied vrij weinig is onderzocht, en nog minder gepubliceerd; dikwijls is het onderzoek ook buitengewoon gehandicapt, doordat geen materiaal van de geïncrimineerde kaas meer is te achterhalen. Men heeft tot op heden nooit kunnen aantonen, wat nu de eigenlijke oorzaak van de kaasvergiftiging is, al zijn er door meerdere auteurs zeer zeker veronderstellingen in de een of andere richting geuit.

De beschrijving der ziekteverschijnselen komt bij alle schrijvers vrijwel overeen. Het zijn de volgende: Eenige uren (gewoonlijk 2—4, soms 8—20) na het eten der kaas (vaak na gebruik van zeer kleine hoeveelheden) treden hevige braken soms met bloederige slijm vermengd, en waterdunne ontlasting op; er is pijn, vooral in de maagstreek; de pols is slap en zeer frequent en onregelmatig; het gezicht is bleek en cyanotisch; de pupilreflex is verminderd. Gewoonlijk zijn deze symptomen na 24 uren geheel verdwenen, en kan de patiënt zeer spoedig

weer zijn normale taak opvatten. Therapeutisch worden soms excitantia gegeven, meestal is de toegepaste therapie echter zuiver expectatief. Sterfgevallen worden, behoudens één maal (Versl. Meded. Volksgezondheid 1923) nooit genoemd. Nooit blijken de patiënten naderhand gevolgen van deze ziekte te ondervinden.

Literatuuroverzicht.

De oudste ons bekende mededeelingen over kaasvergiftiging vindt men bij *Vaughan*. Hij beschrijft een vergiftiging van 300 personen in Michigan. De symptomen waren als bovengenoemd. Als oorzaak vond hij 12 kazen, waarvan er 9 van eenzelfde boerderij afkomstig waren. Van enkele kon hij nog gedeelten achterhalen; deze vertoonden geen bijzonderheden in reuk, smaak of aspect. De kaasbereiding op de betreffende boerderij geschiedde zeer zindelijk en geheel lege artis. Alleen vertoonde de kaas op de versche sneevlakte zwak opalesceerende kleine druppeltjes, die t.o.v. lakmoes sterk zuur bleken te reageeren. Uit deze druppeltjes kweekte *Vaughan* micrococcen, die bij injectie in de oorader van konijnen niet pathogeen bleken te zijn. Voederproeven op hond en kat, zelfs geforceerd en met groote hoeveelheden kaas, verliepen negatief. Bij sectie vertoonden deze dieren geen enkele afwijking.

Vaughan slaagde erin, een in water, alcohol en aether oplosbare kristallijne stof, *tyrotoxine*, af te scheiden, welke in zeer geringe hoeveelheid een brandend droog gevoel in mond, keel, en op de tong, gaf, en diarree veroorzaakte; zij had een scherpe kaasachtige lucht, zooals die door *Husemann* en *Boehm* ook aan giftige worst is waargenomen. Het *tyrotoxine* geeft geen alkaloidreacties, en valt, aan de lucht bewaard, uiteen, waarbij een organisch zuur van onbekende structuur achter blijft.

Vaughan vermeldt *geen paralleelproeven met normale, niet giftige kaas*.

In 1894 beschrijft *Ch. Lepierre* de chemische analyse van een vergiftige schapenkaas. Het gehalte aan eiwit, vet, aschbestanddeelen, enz. was volkomen als dat van andere kaas. Hij slaagde er niet in, om voor *caviae* giftige albuminen of albumosen af te scheiden; daarentegen kon hij wel (met koude koperacetaatoplossing) een zwakbasische, ptomaine-achtige stof ver-

krijgen, die bij voeding aan caviae diarrhee veroorzaakte; evenwel niet toxisch werkte, als zij intraveneus bij konijnen werd ingespoten.

Uit *normale kaas* van verschillenden ouderdom kon hij het ptomaïne niet afscheiden. Lepierre vermoedt met *Metschnikoff*, dat de toxiciteit van sommige kazen op rekening valt te schrijven van abnormaal verloopende bacteriële stofwisseling (= kaasrijping).

Fleischmann zegt in het hoofdstuk „Giftige Käse”: „als men deze eet, treden er spoedig verschijnselen op, zooals men ze bij gastro-enteritis toxica of cholera nostras waarneemt. Het verloop is slechts zelden dodelijk. Herhaaldelijk werden pathogene „Spielarten” van *B. coli* aangetoond”.

Heineman vermeldt de tyrotoxine-, de coli- en de ptomaïne-hypothese. De laatste acht hij van geheel geen beteekenis, omdat de ptomaïnen alleen schadelijk zijn in de zeer groote hoeveelheden, waarin zij bij echte rotting voorkomen. Hij zegt, dat de ware oorzaak der kaasvergiftiging nog duister is, en om nadere bestudeering vraagt. Hij oppert de mogelijkheid, dat, althans sommige gevallen van kaasvergiftiging, te wijten zouden kunnen zijn aan de aanwezigheid van kiemen uit de paratyphus-enteritidis-groep.

In ons land vindt men de eerste mededeeling over kaasvergiftiging van de hand van *van der Moer*. Het betreft hier een in den Gelderschen Achterhoek waargenomen geval, waarbij in 6 gezinnen door een kaas, die uiterlijk goed was, gastro-enterale verschijnselen en kuitkrampen optraden, en waarbij *v. d. Moer* meende als oorzaak van de ziekteverschijnselen een abnormaal hoog tingehalte in de asch te moeten aannemen. Dit zou zijn oorsprong vinden in het gebruik van vertind koperen vaatwerk, in plaats van houten, bij de kaasbereiding. Hij kon geen ptomaïne aantoonen.

Uitvoeriger berichten over kaasvergiftigingen met dezelfde symptomen vindt men in de Versl. en Meded. Volksgezondheid 1920-22-23-24 van de hand van *Bijlsma* en *Hijlkema*, en in die van 1934 van *van Esveld*. Beide eerstgenoemde auteurs vooral hebben tamelijk uitgebreide proeven opgezet. In hun eerste reeks (11 vergiftige kazen) kwamen zij, na bacteriologisch en microscopisch onderzoek tot de conclusie, dat de flora van deze kazen niet afweek van die van volkomen normale kazen, die op dezelfde

wijze werden onderzocht. Bijgevolg meenden zij een bacteriële oorzaak te kunnen uitsluiten.

Vermelding verdient dat zij slechts één maal in deze 11 gevallen (bij een jonge kaas) een coli-achtige bij de gedetermineerde flora vonden; deze wordt volgens hen echter ook in volkomen normale kazen aangetroffen. Zij wijzen terloops op de mogelijkheid, dat in de eerste dagen der rijping giftige stoffen worden gevormd door bepaalde kiemen, die later door de snelle zuring afsterven.

Bij hun toxicologische proeven bleek het Bijlsma en Hijlkema, dat honden, katten en ratten volkomen ongevoelig waren voor voeding met giftige kaas. Bij muizen daarentegen hadden zij met sommige kazen succes. Deze vertoonden apathie, polyurie en verhoogde reflexprikkelbaarheid, knapten soms na verwarming tijdelijk op, maar stierven tenslotte na 1—8 dagen. Bij sectie werden, behalve typisch gezwollen en geïnjecteerde axillaire en lieslympheklieren, geen bijzonderheden aangetroffen, met name geen vergroote milt.

Terloops vermelden B. en H., dat ptomainen wel bij den mensch, daarentegen nooit bij dieren maardarmstoornissen veroorzaken.

Bij gestorven en moribund afgemaakte muizen deden zij cultureel en microscopisch onderzoek van bloed, organen en klieren. Dit verliep dikwijls volkomen negatief; soms werden Gram-positieve coccen en coccobacillen gevonden, en een enkelen keer coli-achtigen. De auteurs beschouwen deze laatste vondsten als van geen waarde, daar deze microorganismen in de agonie uit den darm in het bloed kunnen zijn overgegaan.

Bij sommige kazen scheen het vergift op den duur te verdwijnen.

Met gedurende 10 minuten gekookte kaas gevoerde muizen stierven ook.

De auteurs maakten uit de vergiftige kazen waterige, alcoholische en aetherische extracten, die bij voeding muizen doodden; behalve het typische sectiebeeld der gezwollen lymphklieren werd dan ook dikwijls zwelling der milt, vettige degeneratie der lever of pneumonie waargenomen.

Echter gaf alcoholisch extract van normale kaas precies dezelfde afwijkingen.

Bijlsma en *Hijlkema* entten bloed, orgaan-emulsies en gal

van gestorven dieren over op gezonde muizen. Slechts een maal stierven 2 subcutaan met hersen-emulsie geënte muizen; hersens van deze laatste, subcutaan bij 2 andere muizen ingeënt, veroorzaakten weer den dood. De sectie-verschijnselen hierbij waren echter niet typisch voor kaasvergiftiging.

Door hun onderzoek naar de herkomst der kazen, vatte bij de auteurs de meening post, dat de giftigheid in verband moest staan met melk, die met den inhoud van mond- en klauwzeerblaren aan de tepels ernstig besmet was. Subcutaan ingespoten sediment van blaarinhoud gaf bij 1 muis typische kaasvergiftiging en sectie-beeld; het bacteriologisch onderzoek was ook hier negatief. Met uit het sediment van blaarinhoud gekweekte bacteriën waren de proeven bij muizen negatief. Zij veronderstellen nu, dat doode bacterielichaampjes in het sediment van den blaarinhoud het vergif bevatten; ook van doode proteus-cultures is bekend, dat zij in hevige mate lymphklierzwellings kunnen veroorzaken. De gifstoffen zouden dus van meet af aan reeds in de kaasmelk aanwezig zijn. Bij rustige lezing en critiek ontkomt men niet aan den indruk, dat het mond- en klauwzeer door de schrijvers als *deus-ex-machina* wordt gebruikt.

In 1922 vermelden deze auteurs nogmaals 6 gevallen, waarbij de muizenproef slechts één maal succes heeft gehad, en in 1923 10 gevallen, waarin bij muizen ook slechts 2 maal typische kaasdood optrad. Van een samenhang met mond- en klauwzeer wordt in deze verslagen niet meer gerept. Auteurs zeggen: „Wij komen meer en meer tot de overtuiging dat *tijdens het rijpen* (dus niet *hiervóór*) ook onder normale omstandigheden, voor den mensch giftige stoffen worden gevormd, en dat, indien de rijping abnormaal verloopt, er kwalitatief, dan wel kwantitatief sterkere giftvorming plaats vindt”.

In 1924 worden weer 11 gevallen genoemd, waarbij slechts één maal bij muizen typische kaasdood was te constateeren; ook hier bleek dus voor de zooveelste maal de mensch gevoeliger dan de proefdieren te zijn.

In 1934 slaakte *van Esveld* de opmerking: „De muizenproef laat hoe langer hoe meer in den steek — muizen vertoonen de laatste jaren bij voeding met vergiftige kaas *nooit* meer de typische door Bijlsma beschreven veranderingen, hoewel de kaas *zeker* voor menschen toxisch is geweest”. Hij besluit zijn verslag met de woorden: „Men ziet, dat op dit terrein voor een

systematisch onderzoeker, of iemand met een gelukkigen greep, nog wel iets is te doen”.

H. B. Hijkema zegt met betrekking tot giftige kaas in zijn Leerboek voor Zuivelbereiding: „In zulke kaas zijn wel organismen aangetroffen, welke voortbestaan in normale kaas als gevolg van de snelle ontwikkeling der echte melkzuurbacteriën wordt verhinderd (coli-achtigen), of wel andere dan de gewenschte zuurvormers (micrococcen). Soms is de P_H te hoog, soms evenwel is er absoluut geen teken, dat de gewone melkzuur-streptococcen een te geringe activiteit hadden, is integendeel de kaas kort (te zure reactie). Hier is misschien hun aanvankelijke ontwikkeling te langzaam geweest, zoodat er in het begin gelegenheid is geweest voor verkeerde omzettingen.

Cleijndert bericht in 1927 over een geval van kaasvergiftiging in een gezin van 4 personen, dat onder de gewone verschijnselen verliep; ook 2 politieagenten, die slechts een klein stukje van de (in beslag genomen) kaas hadden gegeten, werden ziek. Het Centraal Laboratorium berichtte hem, dat bij muizen gewone kaasvergiftiging met een typisch sectie-beeld optrad. De bewuste kaas was een 8 maanden oude Goudsche kaas van een zeer zindelijk bedrijf afkomstig, waar ten tijde der bereiding hoegenaamd geen bijzonders aan de melkgift der koeien, noch mond- en klauwzeer werden waargenomen.

De tongblaar-theorie van *Hijkema* c.s. kan *Cleijndert* dan ook niet bevredigen. Hij denkt meer aan slechte bewaring, dat wil dus eigenlijk zeggen: ongunstig verloopende rijping.

Tanner zegt in het hoofdstuk: „Cheese Poisoning”: „*Vaughan* vond tyrotoxine, *Newman* en *Lepierre* ptomaine, en ook *Spica* isoleerde een vergiftige stof, terwijl in 1917 *W. Levin* op grond van agglutinatie-proeven meende, dat er een coli-achtige in het spel was. Hij kon geen tyrotoxine vinden”.

Straub en *Lerner* hebben van 1925—1933 21 gevallen van kaasvergiftiging onderzocht. Zij vermelden negatieve uitkomsten van dierproeven; na 1930 hebben zij dergelijke kazen steeds op coli onderzocht, en daarbij in 15 van 18 malen coli gevonden, terwijl zij deze nooit in gewone kaas aantroffen. Door middel van de indolmethode van *Lerner* konden zij dikwijls nog coli vinden in $\frac{1}{1000}$ à $\frac{1}{10000}$ cm³. Zij vonden, dat in vergiftige kaas alkalische eilandjes voorkomen (aantoonbaar met een oplossing van broomkresolpurpur in geconcentreerde glycerine; de kleur

wordt blauw); zij veronderstellen, dat op deze plaatsen de coli niet door de normale zuurvorming in de kaas wordt gedood, en toxische producten kan vormen.

Vatten wij samen datgene, dat de verschillende auteurs meenen te moeten beschouwen als het aetiologisch moment, dan komt dit in hoofdzaak neer op het volgende: Met uitzondering van v. d. *Moer* wordt algemeen aangenomen, dat we hier te maken hebben met een vergiftiging met door bacteriële werking in de kaas ontstane producten. Verschillende auteurs noemen geen bepaalde kiemen, die de oorzaak zouden kunnen zijn van het ontstaan dezer stoffen. Zij meenen vooral de alkaloïdachtige ptomainen (*Vaughan* het in water, alcohol en aether oplosbare tyrotoxine) als de schuldigen te moeten beschouwen. Anderen daarentegen — vooral de nieuwere auteurs — nemen specifieke producten van een bepaald microorganisme n.l. den coli-bacil, als oorzaak aan. Er is geen enkele auteur, die meent dat er sprake kan zijn van een bacteriëel ziekteproces; algemeen wordt dus aangenomen, dat we hier met een echte voedselvergiftiging te doen hebben. De bewijzen voor de diverse opvattingen zijn echter poover.

Voor wat aangaat de eerste mogelijkheid, n.l. vergiftiging tengevolge van ingestie der in de kaas gevormde ptomainen diene het volgende:

Brieger—Panem—Selmi—Nencki en *Spica* hebben deze stoffen bij bacteriologische omzetting van dierlijk eiwit kunnen aantoonen. Zij beschouwen sommige ervan als oorzaken van voedselvergiftiging, en — bij ziekten, waarbij smetstoffen in het lichaam aanwezig zijn — als de door deze microorganismen uit het levend lichaamseiwit gevormde stofwisselingsproducten, die het ziek zijn tengevolge hebben. Vooral eerstgenoemde auteur heeft veel werk op dit gebied verricht. Hij zegt: ptomaine wordt gevormd in het begin der rotting. Later wordt het weer vernietigd en afgebroken tot NH_3 . Hoe hooger de temperatuur, hoe sneller het verloop. Hij heeft de chemie der bacteriële eiwit-omzetting bestudeerd bij rottend vleesch, visch, menselijke cadavers, kaas, cultures van pathogene bacteriën, e.a., en heeft daarbij verschillende amine-achtige lichamen gevonden, die hij *alle* ptomainen noemt. Zij geven de chemische reacties van alkaloïden en veroorzaken bij proefdieren vaak dezelfde verschijn-

selen als deze. Naast een aantal volkomen onschadelijke ptomainen heeft Brieger de volgende giftige kunnen aantoonen:

neurine, uit vleesch ontstaan, dat bij proefdieren, speciaal konijnen, subcutaan ingespoten, in hoeveelheden van $\frac{1}{200}$ mgr. per KG. levend gewicht reeds toxisch en bij 0.4 mgr. dodelijk werkt. Voornaamste symptomen der intoxicatie: salivatie, kauwbewegingen, dyspnoe, sterk verhoogde darmperistaltiek met voortdurende loozing van weeke faeces. Veelal loozing van sperma en urine. Milt gecontraheerd. Bij dodelijke doses: parese en clonische krampen. Het ontstaat door rotting uit choline; atropine is tegengif.

Per os werkt neurine op dezelfde wijze, maar er zijn dan grotere hoeveelheden noodig. De formule is $\text{CH}_2\text{-CH.N(CH}_3)_3\text{OH}$.

muscarine en *aethyleendiamine* ontstaan beide bij vischrotting. Zij geven bij proefdieren dezelfde symptomen als neurine, met dien verstande, dat konijnen slechts tijdelijk ziek zijn, caviae en muizen daarentegen sterven. De dyspnoe demonstreert zich bijzonder aan de krampachtige borstkas-bewegingen.

In cultures van typhus-bacteriën kon *Brieger* een ptomaine aantoonen, dat bij jonge konijnen en caviae verhoogde secretie van alle klieren, en spierverslavingen (geen krampen) veroorzaakte, benevens pupilverwijding.

Brieger onderzocht tevens jonge weeke, van koemelk gemaakte kaas; deze toch geeft het meest aanleiding tot het ontstaan der vergiftiging. Hij liet ze 6 weken rotten. Hij beschouwt de kaasrijping ook als een eiwitrotting, waarvan echter, ook al doordat de bereiding overal uiteenloopt, nog weinig bekend is. Toxische ptomainen vond hij nooit, ook niet in volkomen rotte kaas.

Voor het afscheiden van ptomainen uit kaas geeft *Brieger* de volgende methode. Fijngemalen kaas wordt met water aangeroerd, en daarna gefiltreerd. Het filtraat wordt zwak zuur gemaakt en daarna wordt HgCl_2 toegevoegd. Na affiltreeren van het neerslag worden zoowel neerslag als oplossing verder onderzocht; door de oplossing en door de suspensie van het kwikneerslag in water wordt H_2S geleid: na affiltreeren van het gevormde HgS worden beide oplossingen ingedampt, waarbij men er zorg voor draagt, dat zij steeds zwak zuur blijven; door toevoeging van alcohol worden de anorganische bestanddeelen

uit de oplossing verwijderd. Bij droogdampen van de alcoholische oplossing blijven de ptomainen achter, die in water oplosbaar zijn.

Lepierre, die de methode van *Armand Gauthier* aanwendde, kon uit giftige schapenkaas een zeer weinig toxisch product afscheiden. Dit zou, zooals reeds eerder werd vermeld, bij caviae, opgenomen per os, aanleiding kunnen zijn tot het optreden van diarrhee, daarentegen bij intraveneuze injectie bij het konijn geen ziekteverschijnselen opwekken. De genoemde methode is als volgt:

Fijngemalen kaas wordt met steriel zand afgewreven, en gedurende 12 uren geextraheerd met aq. dest. Vervolgens wordt afgefiltreerd, en het filtraat behandeld met neutraal loodacetaat; het ontstane neerslag wordt afgefiltreerd waarna de overgebleven vloeistof door doorleiden van H_2S van overtollig Pb wordt bevrijd; vervolgens wordt zij geconcentreerd en gedurende 2×24 uren in de koude gedialyseerd. Alle basen treden hierbij naar buiten. Het gedialyseerde gedeelte wordt geconcentreerd, en na aanzuren met HNO_3 neergeslagen met natriumphosphormolybdaat (160 gr. NaP-molybdaat, 150 gr. HNO_3 , water tot 1 L.). Er vormt zich een dik geel neerslag van de phosphormolybdaten van de basen, dat wordt afgefiltreerd, en gewaschen met zeer verdund HNO_3 , en daarna met water. Zoo worden alle alkaloiden neergeslagen, met inbegrip van de kreatinine-er vormt zich loodphosphaat en loodmolybdaat, terwijl de basen oogenblikken te koken met een overmaat van een oplossing van neutraal loodacetaat, worden de phosphormolybdaten ontleed; er vormt zich loodphosphaat en loodbolybdaat, terwijl de basen met het grootste deel van xanthine en carnine in de vloeistof overgaan, die zuur wordt. Uit de gefiltreerde oplossing worden de overmaat lood en sporen molybdeen weggenomen door behandeling met H_2S in de warmte. De basen, dus ook de ptomainen, blijven in den vorm van acetaten achter. *Gauthier* geeft dan verder aan, hoe de basen van elkander te scheiden.

Het is in dit verband misschien niet ondienstig er even op te wijzen, dat in de moderne chemie het begrip ptomainen niet meer zoo uitgebreid gebruikt wordt als *Brieger* dat deed, maar beperkt is tot de diaminen putrescine en cadaverine.

Betreffende de moderne inzichten over de ptomainewerking vinden we o.a. de volgende uitspraak van *Karrer*: Vele

bacteriën en schimmels kunnen ptomainen vormen; daarom vindt men ze dikwijls in de natuur, en zijn ze o.a. ook uit kaas geïsoleerd. De groote giftigheid der in bacteriële ontleding verkeerende eiwitstoffen berust intusschen niet op hun ptomainegehalte, maar op de aanwezigheid van onbekende giften, z.g.n. toxinen, welker vorming met den bacteriegroei samenhangt.

De methode, volgens welke *Vaughan* tyrotoxine uit kaas verkreeg, is de volgende:

Van de kaas wordt een waterig extract bereid, dat met NaOH alkalisch gemaakt en daarna met aether uitgeschud wordt. Van de verkregen aetherische oplossing laat men de aether bij kamertemperatuur verdampen, waarna het residu in water wordt opgenomen en wederom met aether geëxtraheerd. De nu verkregen aetherische oplossing wordt in vacuum boven zwavelzuur drooggedampt; er blijft een kristallijne stof achter, die toxisch werkt.

Aangaande de mogelijkheid dat specifieke, door *B. coli* in de kaas gevormde, producten de oorzaak der vergiftiging zijn, diene het volgende:

W. Levin heeft deze producten, („volgens *Tanner*”), gemeend te kunnen aantoonen door middel van agglutinatieproeven, waarover ons geen nadere gegevens ten dienste staan. *Straub* en *Lerner* hellen over tot dezelfde veronderstelling, hoewel zij daarvoor geen bewijzen aanvoeren.

Over de pathogeniteit (toxiciteit) van coli-achtigen voor den mensch vindt men o.a. nadere gegevens bij *Bender*, bij *Catel* en *Pallaske* en bij *Plantenga*.

De eerstgenoemde relateert gevallen van acute gastro-enteritis bij zuigelingen en volwassenen door hem en anderen waargenomen, als gevolg van een infectie met kiemen uit de coli-aërogenes groep. In een geval van aërogenes-infectie bij een kunstmatig gevoed kind (symptomen braken en diarree) kon hij zelfs tijdens het leven deze kiemen uit het bloed kweeken.

Catel en *Pallaske* zeggen in hun studies over de zuigelingen-diarree, dat zoowel de uit gevallen van kinderdiarree (dyspepsie-coli), als de van elders afkomstige coli-achtigen (normaal-coli) zeer toxisch zijn. Met gedooide cultures gelukte het hun om binnen 2—4 uren hevige enteritis bij caviae op te wekken; met levende cultures ging dit met dyspepsie-coli wel, met normaal-coli minder goed. Zij concludeeren op grond hunner

proeven (met *Bessau*), dat, als ten gevolge van een disharmonie tusschen de voeding en de verteringscapaciteit van den darm, stagnatie van de chymus en bacteriewoekering in het jejunum plaats vindt, de stofwisselingsproducten der coli-achtigen (die in den dikken darm geen kwaad doen) in staat zijn een toxische beschadiging van den darmwand te voorschijn te roepen.

Plantenga slaagde er in bij jonge kalveren door middel van intraveneuze injectie van gedooide coli-bouilloncultures een ziektebeeld op te wekken, dat volkom analoog was aan dat der colitoxicose bij den zuigeling. Met bouilloncultures van andere kiemen lukte hem dit niet, zoodat er wel een specifiek, door *B. coli* uit bouillon gevormd, product in het spel moet zijn.

Volgens sommigen (*Finkelstein*) zou coli uit melkeiwit en pepton (niet specifieke) amine-achtige lichamen vormen, waarvan de werking ongeveer zou zijn als die van parenteraal toegevoerde eiwitproducten (pepton e.d.). *Plantenga* toonde bij kalveren echter aan, dat noch gedurende $\frac{1}{2}$ uur met trypsine gedigereerde 10% peptonoplossing, noch putrescine bij injectie in staat waren ziekteverschijnselen als boven bedoeld op te wekken. Er moest dus een specifiek colitoxine in het spel zijn.

(*Plantenga* kon bij zijn proeven *niet* aantoonen, dat er een coli-bacteriaemie optreedt, zooals bij den zuigeling moet hebben plaats gevonden in gevallen van coli-pyelonephritis; hier is ze echter ook lang niet steeds aan te toonen. Hij zegt echter, dat de auteurs *Bossert* en *Leichtentritt* in het eindstadium van voedingsstoornissen enkele dagen voor den dood, dikwijls coli in grootere hoeveelheden bloed konden aantoonen).

Gaf *Plantenga* per os gedooide coli-cultuur, dan kon hij binnen $\frac{1}{2}$ uur de symptomen: dyspnoe-buikpijn-verslachte spier-tonus en bloeddiarrhee opwekken; na 12 uren was dit alles, behalve de dunne ontlasting, voorbij. Per rectum ingevoerde doode cultuur veroorzaakte geen afwijkingen. Het dundarmslijmvlies is dus permeabeler voor het toxine.

Vele der symptomen bij colitoxicose moeten volgens *Plantenga* worden opgevat als een direct gevolg van prikkeling van het centrale zenuwstelsel (bijv. „Tiefatmen”, mindere spiertonus (kop en extremiteiten), myosis, apathie, coma), of van degeneratie van het ganglion coeliacum (maag-darm-symptomen).

In een, in 1930 door *Plantenga* beschreven proevenreeks, vermeldt hij dan, dat jonge caviae en jonge muizen precies zoo

gevoelig zijn voor het colitoxine als jonge kalveren. Hij heeft op de eerste de werking en den aard van het colitoxine nader bestudeerd, door jonge caviae van pl.m. 100—150 gram intraperitoneaal in te spuiten. Ter voorkoming van shock worden de dieren tevoren in diepe aethernarcose gebracht. De gevoeligheid is individueel zeer verschillend. Oudere dieren kunnen gemakkelijker immuun zijn geworden voor coli. *Plantenga* beschrijft de verschijnselen na deze behandeling als volgt:

Spoedig na de injectie worden de dieren erg rustig en nemen een „Küchenhaltung” aan, d.w.z. zij kunnen den kop niet meer opheffen, en het achterstel wordt paretisch. De oogen zinken in en tranen, de oogspleet is klein; er treden cyanose (lippen, planta), frequente ontlasting (soms met bloed), opzijvallen en convulsies op. De dood volgt meest na hoogstens 2×24 uur.

Zoowel levende als doode bouilloncultuur veroorzaken deze verschijnselen, de laatste sneller (dood na pl.m. 20 uren). De ingespoten hoeveelheid bedraagt 2 cm^3 per 100 gram cavia.

Typisch is, dat gekookte afgespoelde agarcultuur lang niet zoo toxisch werkt.

Plantenga toonde verder, door gebruik van eiwitvrije voedingsbodems, aan, dat het colitoxine niet gevormd wordt door eiwitomzetting. Voorts dat door koken gedoode, en gewasschen coli-bacteriën vrijwel niet toxisch waren, en het door ultrafiltratie verkregen residu der bouilloncultuur heelemaal niet.

Er moeten dus voor het ontstaan der colitoxicose 2 stoffen in het spel zijn, n.l. 1 gebonden aan de bacterielichaampjes (coli-endotoxine) en 1 vrij in de bouillon (agressine). Dit laatste, dat op vaste bodems weinig of niet schijnt te worden gevormd, verlamt de phagocyten van den gastheer, waardoor de endotoxinen (eventueel de levende colibacteriën zelf) vrij spel krijgen.

Eigen onderzoekingen.

Hier moge volgen het verslag van ons eigen recente onderzoek op dit gebied. Vermeld dient te worden, dat ook wij meermalen vergiftige kaas ter onderzoek aangeboden kregen. Voedingsproeven met muizen verliepen dan steeds negatief. De bewuste kazen waren op het oog volkomen normaal; het bacteriologisch onderzoek gaf ons, naar wij meenden, nooit eenig aanknoopingspunt. Uitgebreide analyses en dierproeven bleven,

dikwijls ook door gebrek aan materiaal, achterwege, tot wij in Augustus 1935 wederom de beschikking kregen over een giftige kaas.

Een stuk komijnkaas is op 3-8-'35 aangebracht door L. te A. Deze heeft geprofiteerd van een „goedkoope aanbieding” van V. te A., welke laatste zijn kaas betreft van een grossier te A. Volgens dezen laatste is de bewuste kaas afkomstig uit een partij 20+ komijnkaas geleverd door de Zulvelfabriek te W. in Noord-Brabant. Door het ontbreken van een duidelijk merk is dit voor ons niet meer na te gaan. Het bij den winkelier aanwezige res-tant (c.a. 5 K.G.) der betrokken kaas is in beslag genomen, en heeft voor het onderzoek gediend.

Volgens L. is het volgende geschied:

Op 1 Augustus hebben 4 der 5 huisgenooten van deze kaas bij het avondbrood gegeten. Na ongeveer 5 uren zijn deze 4 menschen ziek geworden (braking zonder bloed — hevige buikpijn en diarrhee). In den loop van 2 Aug. zijn allen weer beter geworden, en hebben 's avonds weer van deze kaas gegeten, met precies hetzelfde gevolg. Men kwam toen (en zeer terecht) tot de conclusie, dat de kaas de oorzaak der ellende was, en riep de hulp van den Keuringsdienst van Waren in.

Onderzoek van het aangebrachte stuk

aspect: normaal smaak en reuk: goed
rijping: belegen consistentie: normaal
Ph 6.0 Melksulker: afwezig

Bacteriologisch onderzoek volgens *Tanner*:

aantal kiemen op agar na 10 dagen bij 37° C.: 600.000 per gram.

coli-achtigen in $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{2000}$ en $\frac{1}{200.000}$ gram na 2 dagen bebroeden in trypaflavinebouillon bij 37° C. niet aan te toonen.

Microscopisch onderzoek van een volgens Gram gekleurd uitstrijkapparaat der kaas: weinig kiemen; aanwezig vooral Grampositieve coccen en enkele staafjes, voorts zeer weinig Gramnegatieve staafjes.

Een steriel genomen stukje der kaas, ter grootte van een erwt, werd geënt op 50 gram peptonwater en 24 uren bij 37° C. bebroed; er was toen sterke groei en indolvorming aan te toonen. Via de Endo-plaat (waarop een paarsrood, niet metaalglanzend

beslag ontstond) werd een kiem geïsoleerd, die na controle der morphologische en biologische eigenschappen, een coli-achtige bleek te zijn.

Met deze 24 uur oude peptonwater-cultuur werd als volgt gehandeld:

A. Op 5 Aug. werden 2 *volwassen* muizen met $\frac{1}{2}$ cm³ subcutaan aan de staartplooï ingespoten, en gezet op een diët van geplette haver en leidingwater. Op 8 Aug. vertoonden deze dieren een ruw haarkleed en geringen eetlust, maar verder geen enkel symptoom van ernstig ziek zijn; een der beide muizen is op dien dag gechloroformeerd: bij direct daarop volgende sectie was niets bijzonders te vinden, behoudens misschien een lichte dundarmcatarrh; stukjes van hart, lever, nier, en verder iets maag- en dundarminhoud werden over Endoplaten gestreken. Er ontwikkelden zich resp. 12-14-3-10 en 35 kolonies, die later werden geïdentificeerd als *B. coli*!

Op 14 Aug. was de andere muis nog kerngezond; zij is niet verder geobserveerd.

B. Op 5 Aug. zijn 3 *jonge* muizen gezet op een diët bestaande uit een papje van bij 100° C. gedroogd wittebrood en met NaHCO₃ flink alkalisch gemaakte rest der peptonwater-cultuur, benevens leidingwater.

Op 8 Aug. was dit voer geheel op, en waren de dieren kerngezond. Een is er opgeofferd, als onder A beschreven. De sectie gaf een negatieve uitkomst te zien. Uit hart, lever, nier, maag- en darminhoud waren weer in flinken getale coli-achtigen te kweken, uit maag- en vnl. darminhoud werden bovendien Grampositieve coccen, diplococcen en streptococcen gekweekt. De overblijvende muizen zijn verder gevoerd met geplette haver en leidingwater, en hebben tot het einde der proef op 14 Aug. verder geen enkele afwijking vertoond.

C. Tevens is op 5 Aug. aan 2 *volwassen* muizen verstrekt 50 gram gemalen kaas en overvloedig leidingwater; op 8 Aug. was de kaas opgegeten, en is verder geplette haver gevoerd tot 14 Aug. De dieren hebben geen enkele afwijking vertoond.

Op 10 en 12 Aug. zijn enkele gezonde muizen afgemaakt. Bij geen enkele kon uit de organen of den dundarminhoud op de Endo-plaat *B. coli* worden gekweekt.

De verdere proeven vonden plaats met de pl.m. 5 K.G. in beslag genomen kaas. Allereerst werd nagegaan, of op de versche

sneevlakten met een oplossing van broomkresolpurpur in glycerine de door *Straub* en *Lerner* beschreven alkalische eilandjes waren aan te toonen; slechts één dubieus blauw plekje werd gevonden. Ook opalesceerende druppeltjes (*Vaughan*) werden niet gezien. Ook nu werd in de kaas, thans in een platina-oogje vol, *B. coli* gevonden.

D. Allereerst werden nu op 12 Aug. 3 *jonge* muizen gezet op een diëet van 50 gr. geraspte kaas en leidingwater. Na 24 uren werd één dezer dieren afgemaakt; de sectie gaf een volkomen normaal beeld te zien; uit hart, lever, nier, en dundarm-inhoud was geen *coli* te kweken.

De beide andere jonge muizen stierven na 3, resp. 4 dagen; beide vertoonden bij sectie een flink ontwikkelde dundarm-ontsteking. Bij bacteriologisch onderzoek van één der twee bleek dat uit het hart en de lever geen, uit de nier sporadisch en uit het jejunum zeer veel *B. coli* was te kweken.

Met een versche 24 uur oude peptonwatercoli-cultuur uit kaas werden 3 groepen van muizen behandeld:

E. 2 *volwassen* muizen werden op 13 Aug. elk met 0.3 cm³ subcutaan ingespoten. Den volgenden dag stonden de haren overeind; de eetlust en ontlasting waren normaal. Op 14 Aug. werd er een afgemaakt, waarvan de sectie te zien gaf: een iets vergroote milt en misschien een lichte darmcatarrh. Uit lever en nier (niet uit hart en dundarminhoud) was *B. coli* te kweken. Bij tot 21 Aug. voortgezette observatie bleef de andere muis volkomen gezond.

F. 3 *jonge* muizen werden op 13 Aug. gevoerd met een papje van brood en 25 cm³ der cultuur en leidingwater. Op 14 Aug. werden geen bijzondere verschijnselen waargenomen; eetlust en ontlasting waren goed; een op dien dag afgemaakte muis gaf bij sectie geen afwijkingen. In de organen werden geen, in het jejunum zeer veel *B. coli* gevonden.

De beide andere muizen vertoonden bij observatie tot 21 Aug. geen enkele afwijking.

G. Op 13 Aug. werd ingezet een groep van 3 *jonge* muizen als onder F, alleen werd aan de pap NaHCO_3 tot flink alkalische reactie toegevoegd.

(Opgemerkt dient te worden, dat peptonwatercultuur van *B. coli* op zichzelf reeds alkalisch is. Door een alkalische reactie wordt de vernietigende werking van het maagsap op *B. coli* ge-

remd, en bovendien is onder deze omstandigheden, volgens mondelinge mededeeling van *Dr. Plantenga*, de mucosa van den dunnen darm meer permeabel).

Op 14 Aug. bleken deze dieren nog niet veel gegeten te hebben, en volkomen gezond te zijn; een werd er afgemaakt: bij sectie werden geen afwijkingen aangetroffen; uit de organen was geen, uit het jejunum veel *B. coli* te kweken. De beide andere dieren bleven tot 21 Aug. volkomen gezond.

Van de op 8 Aug. afgemaakte volwassen en jonge muis (zie sub A. en B.) werd een 24 uur oude peptonwatercultuur van *B. coli*, gekweekt uit het hart van elk dezer dieren (via Endoagar, Chalmers-glucosebouillon en schuinen agar), gemengd. Met dit mengsel werden weer 3 groepen van muizen behandeld:

H. Op 14 Aug. werd bij elk van 2 *volwassen* muizen subcutaan ingespoten 0.35 cm³. Op 15 Aug. werd 1 muis afgemaakt; deze vertoonde geen ziekteverschijnselen, noch afwijkingen bij de sectie. Uit lever en nier was *B. coli* te kweken, uit hart en jejunum niet.

De 2e muis is op 21 Aug. gestorven, na reeds enkele dagen ernstig ziek te zijn geweest. Bij sectie werd een haemorrhagische enteritis gevonden; daar het cadaver een halven dag was blijven liggen, werd geen cultuur aangelegd.

J. Op 14 Aug. werden 2 *jonge* muizen gevoerd met een papje van brood en deze cultuur. Na 24 uren werden geen ziekteverschijnselen waargenomen. De na één dag afgemaakte muis uit deze groep had bij sectie een zeer volle maag: het diët was dus schijnbaar in den smaak gevallen! Uit de nier waren enkele, uit het jejunum zeer veel, uit hart en lever geen *B. coli* te kweken.

De 2e muis stierf op 21 Aug. en vertoonde bij sectie gezwollen lever en nieren, alsmede enteritis haemorrhagica. Cultures werden hier niet aangelegd.

K. Op 14 Aug. zijn tevens 2 *jonge* muizen gevoerd met een dergelijk papje, dat met NaHCO₃ alkalisch was gemaakt. Na 24 uren was ook hier bij leven en bij sectie geen afwijking. Cultuur uit organen negatief; uit het jejunum werd *B. coli* gekweekt in vrij groote hoeveelheid.

De 2e muis bleef bij observatie tot 21 Aug. gezond.

Uit deze proevenreeks vallen de volgende conclusies te trekken:

1e. De kaas week in eigenschappen oogenschijnlijk weinig af van gewone kaas. De microflora was tamelijk wel normaal, zoowel kwalitatief als quantitatief. Echter was in kleine hoeveelheden dezer kaas (> 0.05 gram) *B. coli* aan te toonen. Alkalische eilandjes werden niet gevonden.

2e. Voederproeven bij *volwassen* muizen met deze kaas gaven geen resultaat (zie C.).

3e. Idem bij *jonge* muizen leidden na 3—4 dagen tot den dood. Bij sectie werd een flinke enteritis gevonden. Uit jejunum en nier was *B. coli* te kweeken (D.).

4e. Voederproeven met al of niet door toevoeging van NaHCO_3 alkalisch gemaakte peptonwatercultuur van *B. coli*, direct uit kaas gekweekt, bij *jonge* muizen (zie B., F. en G.) verliepen zonder ziekteverschijnselen. Na 1—3 afgemaakte dieren vertoonden bij sectie geen afwijkingen; na 24 uur was in het jejunum veel *B. coli* te vinden (F. en G.), na 3 dagen bovendien in de organen.

5e. Subcutane injectie van peptonwatercultuur van *B. coli*, direct uit kaas gekweekt, in hoeveelheden van $0.35\text{--}0.5\text{ cm}^3$ veroorzaakte bij *volwassen* muizen geen of geringe ziekteverschijnselen (A. en E.). Na 1 en 3 dagen afgemaakte dieren vertoonden een zeer lichte darmcatarrh. Na 1 dag was in lever en nier, na 3 dagen bovendien in hart en maag- en dunderminhoud *B. coli* aan te toonen.

6e. De onder 4e en 5e genoemde aanwezigheid van de rechtstreeks uit kaas gekweekte *B. coli* in dunne darm en organen scheen nòch voor jonge, nòch voor oude muizen gevaar voor leven en gezondheid op te leveren.

7e. Voederproeven met peptonwatercultuur van *B. coli* na muizenpassage veroorzaakten bij *jonge* muizen binnen 7 dagen den dood door het optreden van haemorrhagische enteritis en orgaandegeneratie. Reeds na 24 uren was behalve in het jejunum, ook in de nieren *B. coli* aan te toonen (J.).

Voederproeven met dezelfde materie, flink alkalisch gemaakt, verliepen negatief, ondanks het feit, dat in het jejunum na 1 dag veel *B. coli* was aan te toonen (K.).

8e. Subcutane injectie van peptonwatercultuur van *B. coli* na muizenpassage in hoeveelheden van 0.35 cm^3 , veroorzaakte

bij *volwassen* muizen den dood na 6 dagen, onder het beeld van een haemorrhagische enteritis. Reeds na 24 uren was *B. coli* in lever en nier aan te toonen (*H.*).

Gebleken is dus:

A. Voeding der kaas kan bij *jonge* muizen den dood veroorzaken onder het beeld van een enteritis haemorrhagica.

B. De uit kaas in peptonwater gekweekte *B. coli* is slechts na dierpassage onder bepaalde omstandigheden pathogeen voor jonge en oude muizen, alhoewel bij verscheidene proefdieren een meer of minder duidelijk uitgesproken colibacteriaemie of op-hooping van *B. coli* in het jejunum viel te constateeren.

De meest waarschijnlijke verklaring voor dit eigenaardige verschijnsel is:

1. dat de muis weinig gevoelig is voor coli-achtigen,
2. dat bij de rijping der kaas toxische stoffen worden gevormd, die de weinige met de kaas binnengedrongen coli een gunstige kans op ontwikkeling geven, (event. coli-endotoxinen en -agressinen volgens *Plantenga*).

3. dat deze toxische stoffen ontbreken in de coliculturen die rechtstreeks uit de kaas op peptonwater zijn gekweekt.

Terloops zij opgemerkt, dat nooit bij sectie de door *Bijlsma* en *Hijkema* beschreven typische lymfklierzwellingen zijn waargenomen.

Echter — en dat is van veel belang — wijken de bij muizen geconstateerde ziekteverschijnselen sterk af van het beeld der peracuut optredende vergiftiging, zooals het bij den mensch is waargenomen. Het was dus wenschelijk om, hetzij voor coli specifieke, hetzij andere toxinen in de kaas aan te toonen, die deze verschijnselen zouden kunnen veroorzaken, en omgekeerd, te trachten door het fabricceeren van kaas, waarin een aantal uit kaas via muizen gekweekte coli-stammen was verwerkt, te komen tot een kunstmatig vergiftig gemaakte kaas.

Proeven tot het aantoonen van vergiften in de kaas.

In aanmerking komen ptomainen, tyrotoxine, zware metalen en colitoxinen.

A. 100 gram gemalen kaas werden afgewreven met steriel zand en een ruime hoeveelheid aq. dest., en na een verblijf van

2 uren in de ijskast behandeld volgens *Brieger*. Het ontstane kwikneerslag, dat dus een deel der event. aanwezige ptomainen moest bevatten, werd gescheiden van de rest (waarin event. andere ptomainen) en daarna weer tot oplossing gebracht als vroeger beschreven. Beide oplossingen werden tenslotte ingedampt:

1. Uit het kwikneerslag werd een behoorlijke hoeveelheid (5—10 mgr.) zuiver kristtallijn en kleurloos neerslag verkregen, dat een lichte kaaslucht vertoonde en eenigszins bitter smaakte; het gaf wel de alkaloïdreactie met natriumphosphormolybdaat, niet die met pikrinezuur. Het neerslag werd opgelost in 6 cm³ aq. dest., waarvan 1½ cm³ subcutaan bij een volwassen cavia werd ingespoten; dit dier heeft geen enkele afwijking vertoond. Een met 4½ cm³ ingespoten konijn vertoonde eveneens geen afwijkingen.

2. Uit het restant van het kaasextract moeten, na verwijdering van de anorganische bestanddeelen, bij indampen de in water oplosbare event. aanwezige andere ptomainen, die bij caviae diarrhee zouden veroorzaken, achterblijven.

Inderdaad werd ca. 10 mgr. van een bruingekleurd kristallijn product verkregen, waarvan de reuk zeer sterk stekend kaasachtig, en de smaak intens bitter was; het gaf alkaloïdreactie, zoowel met natriumphosphormolybdaat, als met pikrinezuur. Het werd opgelost in 15 cm³ aq. dest., en 1/10 deel hiervan bij een volwassen cavia ingespoten; het dier heeft geen afwijkingen vertoond. Een cavia, gevoerd met brood en de rest dezer oplossing, heeft eveneens geen bijzondere verschijnselen te zien gegeven.

Op grond van de proeven A1 en A2 moet worden aangenomen, dat de kaas geen vergiftige ptomainen bevatte.

B. Met een volgens *A. Gauthier* uit pl.m. 100 gram kaas bereid extract (dat alkaloïdreactie gaf met pikrinezuur) zijn 2 caviae, 1 konijn en 1 muis subcutaan ingespoten; tevens is een voederproef met caviae, zooals *Lepierre* aangeeft, verricht. Geen van deze dieren heeft ook maar de minste afwijking vertoond.

Proef B. bevestigt dus den uitslag verkregen bij proef A; ook volgens deze methode was geen vergiftig ptomaïne aan te toonen.

C. Volgens *Vaughan* bereid extract, dat eventueel aanwezig tyrotoxine zou moeten bevatten, is gevoederd aan een

cavia en een konijn. Ook hier was er geen resultaat, en bleek er niets van een darmaandoening bij de dieren.

D. Voor het aantoonen van event. aanwezige zware metalen werd de volgende werkwijze gevolgd:

10 gram kaas werden verascht, de asch in verdund HCl opgenomen, en vervolgens H_2S door de oplossing geleid; er ontstond zelfs geen troebeling, zoodat geconcludeerd mag worden, dat zware metalen afwezig waren.

E. Voor het aantoonen van vergiftige coli-producten is gebruik gemaakt van de werkwijze door *Plantenga* aangegeven (intraperitoneale injectie bij diep genarcotiseerde jonge caviae). *Plantenga* beweert dat coli-endotoxinen en -agressinen thermostabiel zijn. Daarom is de eerste serie proeven verricht met gekookt kaasextract, volgens onderstaand voorschrift bereid.

50 gram kaas met steriel zand en 30 cm^3 aq. dest. grondig afwrijven, eenigen tijd laten staan (voortdurend roeren) en vervolgens 5 à 15 minuten centrifugeeren teneinde grove deelen te verwijderen. De verkregen vloeistof wordt *gekookt*, en vervolgens bij jonge caviae intraperitoneaal ingespoten als volgt:

Cavia no. 1. Gewicht 98 gram. 2 cm^3 kaasextract. Heeft geen afwijkingen vertoond.

Cavia no. 2. Gew. 95 gr.; 2 cm^3 kaasextract; na 17 uren ziek: „Kückenhaltung”, iets slap in de achterhand, geen duidelijke parese (kan zich nog vrij goed bewegen), cyanose (planta achterbeenen en ooren), haren overeind, pupil niet vernauwd of verwijd, geen tranenvloed of speekselen, geen diarrhee. Na 24 uren was het dier weer volkomen gezond.

Cavia no. 3. Gew. 130 gr.; $1\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ kaasextract en $\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ gewassen en gedooide *B. coli* suspensie (voor het aantoonen van agressinen in het kaasextract); na 2×24 uren nog geen enkele afwijking.

Cavia no. 4. Gew. 150 gr.; als no. 3; na 1 dag iets traag, oogspleet bijna gesloten; heeft echter geen parese vertoond, en was na 2×24 uren weer gezond.

Cavia no. 5. Gew. 130 gr.; $1\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ kaasextract en $1\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ ultrafiltraat van door koken gedooide bouilloncultuur van *B. coli* (teneinde event. in de kaas aanwezige coli-endotoxine aan te toonen). Het dier heeft geen enkele afwijking vertoond.

Cavia no. 6. Gew. 180 gr.; als no. 5; ook geen afwijkingen.

Cavia no. 7. (Controle-cavia). Gew. 130 gr.; intraperitoneaal ingespoten met 3 cm³ door koken gedooide 24 uur oude bouilloncultuur van *B. coli*; gestorven na pl.m. 12 uren; vertoonde bij sectie het beeld van een hevige haemorrhagische enteritis.

De voor deze proeven gebruikte coli-bacteriën waren uit de giftige kaas gekweekt.

De bij elke cavia ingespoten hoeveelheid extract correspondeerde bij deze proeven met 3 à 5 gram kaas.

Alleen bij cavia no. 2 zijn verschijnselen waargenomen, die eenigszins kunnen doen denken aan colitoxicose in lichten graad.

Geconcludeerd mag dus worden, dat, zoo al op grond van het verloop bij cavia no. 2 de aanwezigheid van colitoxine en agressine niet geheel mag worden uitgesloten, de hoeveelheid hiervan in het verkregen gekookte extract in elk geval te gering is geweest om duidelijke verschijnselen op te wekken. Uit het met cavia no. 7 verkregen resultaat blijkt wel, dat de gebruikte jonge dieren voor het colitoxine nog erg gevoelig waren.

Proeven met *ongekookt* kaasextract.

40 gram geraspte kaas werden in een steriel mortier grondig afgewreven met steriel zand en met 40 cm³ aq. dest.; na eenigen tijd onder geregeld roeren te hebben gestaan, werd de geheele massa gecentrifugeerd gedurende 15 min., waarbij 30 cm³ extract werden verkregen. Hieraan werden toegevoegd 3 cm³ 5%-carboplossing, om event. infecteerende banale kiesen onschadelijk te maken. Vervolgens werden jonge caviae als volgt ingespoten:

Cavia no. 8. Gew. 100 gr.; ingesp. 2 cm³. Direct na de inspuiting traden er, ondanks de diepe narcose, clonische krampen op, die bleven aanhouden; het dier is binnen 12 uren gestorven. Sectie gaf geen enkele afwijking te zien (Shock?).

Cavia no. 9. Gew. 95 gr.; ingesp. 2 cm³. Verl. als bij no. 8.

Cavia no. 10. Gew. 150 gr.; extra diepe narcose; ingesp. 3 cm³. Verloop als bij no's. 8 en 9; gestorven na 5 uren.

Cavia no. 11. Gew. 150 gr.; 3 cm³. Verloop als bij nos. 8, 9 en 10; dood na 7½ uur.

Proeven met ongekookt kaasextract, volkomen gelijk aan het vorige, waaraan echter geen carbol is toegevoegd.

Cavia no. 12. Gew. 150 gr.; ingesp. 3 cm³; binnen 15 minuten na de inspuiting gestorven, zonder shock-verschijnselen te hebben vertoond; het bewustzijn is na de narcose niet meer goed teruggekeerd.

Cavia no. 13. Gew. 150 gr.; 3 cm³ extract; verloop precies als bij no. 12.

Cavia no. 14. Gew. 150 gr.; 3 cm³; heeft geen enkele afwijking vertoond. Elke cavia werd ingespoten met een hoeveelheid extract, corresponderende met 3 à 4 gram kaas.

Tevens werden met dit extract 2 niet geheel volwassen muizen ingespoten (ook onder narcose), elk met $\frac{1}{2}$ cm³, de eene subcutaan, de andere intraperitoneaal. De eerste was na 4—5 uren paretisch en tamelijk ziek; na 15 uren lag ze dood in de kooi; bij sectie werd een iets opgezette dunne darm, met vaat-injectie en slijmigen inhoud, gevonden. De intraperitoneaal ingespoten muis is eerst iets trager geweest, maar na eenige uren geheel hersteld en gezond gebleven.

Op grond van de proeven met de caviae 8 tot en met 14 en de beide muizen moet worden geconstateerd dat ook op deze wijze in de kaas coli-toxine niet met zekerheid was aan te toonen. De mogelijkheid blijft natuurlijk bestaan, dat een andere extractiemethode zou moeten worden gevolgd, en dat hiermee dan een meer bevredigend resultaat zou zijn verkregen.

Waar bij geen enkele andere onzer vele intraperitoneaal na narcose ingespoten caviae shock optrad, blijft het de vraag, of de verschijnselen bij caviae 8 tot en met 11 waargenomen als shock moeten worden opgevat, dan wel beschouwd als een specifieke beschadiging van het centrale zenuwstelsel.

Eenigszins in deze richting wijst ook de peracute dood na de behandeling der caviae 12 en 13, hoewel hier natuurlijk ook sprake kan zijn van een direct gevolg van de narcose. (Terloops dient opgemerkt, dat volgens *Plantenga* het colitoxine het centraal zenuwstelsel prikkelt).

Typisch is ook, dat de subcutaan ingespoten muis paretisch werd, en bij sectie een enteritis vertoonde.

Practisch gesproken moet dus de vraag: „zijn in de vergiftige kaas ptomainen, tyrotoxine, zware metalen of colitoxinen aangetoond?” ontkennend worden beantwoord, al dient ten aanzien van de laatste eenige reserve te worden gemaakt.

Bij ons kwam nu de idee op, dat mogelijkerwijs door de inwerking der digestiesappen uit deze kaas producten zouden kunnen zijn ontstaan of vrij gemaakt, die niet uit normale kaas ontstaan, dan wel daarin aanwezig zijn. Het was dus zaak, te trachten de digestie in vitro na te bootsen. Hierbij gold de overweging, dat van een pepsine-inwerking op de kaas niet veel meer was te verwachten, aangezien zij die bij het stremmen al had ondergaan, maar dat mogelijk de trypsine een of anderen invloed kon hebben. Dit te meer, daar de ziekteverschijnselen bij den mensch optreden op een zoodanig uur na het gebruik der kaas, dat mag worden aangenomen, dat zij zich in den dunnen darm bevindt, en de aldaar heerschende invloeden ondergaat.

Voor de volgende proeven werd gebruik gemaakt van een op de hier beneden omschreven wijze gemaakt extract.

50 gram gemalen kaas werden met een zoo steriel mogelijk ontnomen en in fijne stukjes geknipte halve pancreas van een varken, met steriel zand en 60 cm³ gekookt aq. dest. grondig afgewreven in een steriel mortier, en daarna gedurende 2½ uur bij 37° C. geplaatst. Vervolgens werd gedurende 15 minuten gecentrifugeerd, en met het verkregen centrifugaat als volgt gehandeld:

Cavia no. 15. Gew. 150 gr.; subcutaan ingesp. 4 cm³. Geobserveerd gedurende een week; heeft geen afwijkingen vertoond.

Cavia no. 16. Gew. 150 gr.; intraperitoneaal ingesp. 4 cm³. Na. 4 à 5 uren verminderde reflexprikkelbaarheid en parese, vooral in de achterhand; is na pl.m. 14 uren gestorven. Bij sectie werd het volgende waargenomen: uitvloeiingen uit de natuurlijke openingen en diarrhee ontbreken; op de injectieplaats iets oedeem; de subcutane bloedvaten zijn niet bijzonder gevuld; zwelling van boeg- en liesklieren ontbreekt; er is geen spoor van peritonitis waar te nemen; op den dunnen darm liggen 2 draad fijne fibrinevlokjes; het darmkanaal biedt het volgende beeld: dunne darm; slijmvlies sterk gezwollen met vaatinjectie; inhoud mucopurulent; Peyersche plaque sterk gezwollen met enkele bloedinkjes; scheil plaatselijk oedemateus; andere darmen scheilgedeelten en andere organen geen afwijkingen; het hart is in diastole blijven stilstaan.

Dit beeld lijkt dus sterk op dat van de door Plantenga beschreven colitoxicosis bij zijn proefdieren.

Proeven op muizen.

Een volwassen muis is subcutaan ingespoten met $\frac{1}{2}$ cm³ centrifugaat. Na $3\frac{1}{2}$ dag was zij ongeveer geheel verlamd, en vertoonde polyurie. De sectie leverde geen bijzonders; wel was het darmkanaal sterk gevuld. Uit de organen werd een Endoplaat geënt, waarop geen groei optrad.

Een volwassen muis is intraperitoneaal ingespoten met $\frac{1}{2}$ cm³ centrifugaat, en gedurende 7 dagen geobserveerd; het dier heeft geen afwijkingen vertoond. 2 jonge muizen zijn gevoerd met een diëet van blokjes bij 100° C. gedroogd brood, gedrenkt met de rest van het centrifugaat. Voor overvloedig schoon drinkwater (bij kaasproeven steeds van groot belang) werd gezorgd.

Na $2\frac{1}{2}$ dag waren beide dieren zeer ziek, konden zich nog slechts kruipend voortbewegen, en vertoonden polyurie. Na $3\frac{1}{2}$ dag was er één gestorven: deze vertoonde bij sectie neusuitvloeiing en darmscatarrh; de andere is na $3\frac{1}{2}$ dag afgemaakt: bij sectie werden geen sprekende afwijkingen gevonden. Op met organen geënte Endoplaten ontstond geen groei.

Opgemerkt moet worden, dat deze laatste muizen ook onder narcose werden ingespoten, welke behandeling zij zeer goed doorstonden.

Als het geringe aantal proeven dezer laatste reeks het trekken van eenige gevolgtrekking veroorlooft, dan is het wel in de eerste plaats deze, dat ook de met trypsine behandelde kaas voor enkele der gebruikte proefdieren giftig is geweest, en dat het opgewekte beeld bij één cavia doet denken aan datgene, dat Plantenga aangeeft voor colitoxicosis bij kleine proefdieren. Het is dus niet geheel onwaarschijnlijk, dat colitoxinen in het laatste preparaat aanwezig zijn geweest. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn, dat door de trypsinewerking de kaassubstantie fijner wordt verdeeld dan met de andere werkwijzen, waardoor de mogelijk aanwezige colitoxinen nu in grootere concentratie kunnen zijn verkregen dan bij de vorige extractiemethoden. O.i. ligt hierin een aanwijzing in welke richting een nader onderzoek zich zal hebben te bewegen, dat ten doel heeft, de door deze laatste proevenreeks voor ons meer aannemelijk geworden colihypothese nader te steunen.

Doordat het weinige materiaal, dat ons nog overbleef, door

schimmelings onbruikbaar geworden was, hebben wij op dit gebied geen uitgebreidere waarnemingen kunnen doen. Restte ons nog te trachten met eenige der verkregen coli-stammen een of meer zoo mogelijk giftige kazen te fabriceren, en de eigenschappen daarvan na te gaan, meer speciaal te onderzoeken in hoeverre het in deze experimenteel geïnfecteerde kazen zou mogen gelukken colitoxinen aan te toonen. Daarnaast wenschten wij het gedrag van willekeurige normale kaas, die op dezelfde wijze werd onderzocht, te leeren kennen.

Op 29 Augustus 1935 zijn daartoe een 7-tal pl.m. 1 week oude coli-culturen op schuinen agar, alle gekweekt uit voor onze proeven gebruikte muizen, afgespoeld met in totaal pl.m. 40 cm³ peptonwater; ongeveer 1 uur nadien is deze afspoeling gemengd met ½ L. versche en hooggepasteuriseerde ondermelk in een steriele flesch, en gedurende 1 uur in de broedstoof geplaatst in de Zuivelfabriek te Z. Vervolgens is hiermede een mengsel van 20 L. versch gepasteuriseerde ondermelk en 10 L. versche (warme) rauwe melk van een goeden stal geënt, waarna direct is overgegaan tot het bereiden van kaas hieruit (vooraf toevoeging van reincultuur en CaCl₂, stremming bij 30° C.). Verkregen werden 4 „lunch” kaasjes, elk van pl.m. ¾ K.G. gewicht. De eerste dagen werden deze door de enorme vermeerdering der *B. coli*, en daarmee gepaard gaande gasvorming, erg bol; later in den pekelbak werden zij z.g.n. rustig. Toen de kaasjes na pl.m. 3 weken aan het laboratorium arriveerden voor verder onderzoek, waren zij op het oog redelijk goed uitgevallen.

Eerste onderzoek der met B. coli gemaakte kaas.

Op 24 Sept. 1935 is door een onzer (M.) 75 gram van deze kaas gegeten. Er traden hoegenaamd geen verschijnselen van minder welbehagen op.

De analyse der kaas leerde het volgende:

aspect: vrij normaal. Hoewel iets bol, geen bijzondere teekenen van „knijper”.

hardheid: behoorlijk gerijpte kaas.

sneevlak: kleine gasholtetjes over het geheele overvlak verspreid; in deze holtes schijnbaar iets verweekt, alsof er iets vloeistof in staat. Met de oplossing van broomkresolpurpur in glycerine is slechts 1 holtetje iets blauw gekleurd, terwijl verder het geheele sneevlak de gewone geelgroene kleur vertoont.

Aantal op agar kweekbare kiemen 6.000.000 per gram (na 10 dagen).

Coli-achtigen zijn in de kleinst-ingezette hoeveelheid, n.l. $\frac{1}{10.000}$ gram aangetoond binnen 24 uur (gebruikte bodem trypaflavinebouillon).

Microscopisch onderzoek van een uitstrijkje van pl.m. $\frac{1}{2}$ platina oogje kaas: enkele Gram positieve diplococcen, en zeer sporadisch Gram negatieve staafjes.

Reactie duidelijk zuur t.o.v. lakmoes; P_H niet bepaald.

Vrije lactose niet aanwezig.

Smaak: vrij zout en tamelijk ordinair, niet walgelijk.

Reuk: geen bijzonders.

Op 24 Sept. zijn met pl.m. 50 gram geraspte kaas 3 *jonge* muizen gevoerd. Deze kaas is geheel opgegeten; de dieren hebben geen afwijkingen vertoond.

Daar de kaas dus op dit moment nog geen vergiftige werking op den mensch en kleine proefdieren had, achtten wij het verstandiger het rijpingsproces nog eerst eens verder voort te laten gaan, alvorens een uitgebreider onderzoek in te stellen. Dit vond eerst plaats op 15 November 1935 en volgende dagen. Tegelijkertijd werden proeven met normale kaas genomen.

Allereerst werd door ons beiden weer van het tweede der met B. coli geïnfecteerde kaasjes gegeten. Een van ons (M.) bleek ook nu weer na gebruik van pl.m. 60 gram hoegenaamd geen nadeelige gevolgen te ondervinden. De andere (T.) was pl.m. 16 uren na gebruik van pl.m. 30 gram kaas minder goed gedisponeerd; hij noteerde de volgende symptomen: tympanisch gevoel in de maag, geen pijn; geen eetlust; versnelde en weeke defecatie. Er was dus eenige aanwijzing dat de kaas niet geheel onschuldig meer was, al waren de symptomen niet die van de „kaasvergiftiging”.

Een bacteriologisch en chemisch onderzoek der kaas leerde het volgende:

(tegelijkertijd werd een analyse van normale kaas gedaan)

COLIKAAS		NORMALE KAAS
iets bol, wat knijperig, geheel rijp zône van pl.m. $\frac{1}{2}$ cm onder de korst sterk ingedroogd en zeer hard; zuivel maakt een drogen indruk; veel zeer kleine gas- holtetjes met iets vocht	aspect hardheid sneevlak	geen bijzonderheden, goed gerijpte kaas glad, zonder noemenswaardige holten; zuivel maakt een goe- den indruk wat betreft con- sistentie

1.500.000 per gram	} kweekbare micro-organismen	{ 415.000 per gram
aangetoond in de kleinste gebruikte hoeveelheid, n.l. 0.0001 gram	} B. coli	{ in 0.1 gram niet aangetoond
in een uitstrijkje van $\frac{1}{4}$ oese kaas geen kiemen te vinden	} microscopisch	{ Gram+ staafjes en korte streptococci
met Gramkleuring zuur t.o.v. lakmoes, 6.1 niet aanwezig	} reactie, P_H vrije lactose	{ zuur t.o.v. lakmoes, 5.9 niet aanwezig
zout, overigens redelijk goed geen bijzonderheden	} smaak reuk	{ goed, smakelijk geen bijzonderheden

Met beide kaassoorten zijn proeven op jonge caviae genomen, als volgt:

Groep A, bestaande uit 2 caviae van 120 gram elk; deze zijn intraperitoneaal ingespoten met het extract, dat verkregen werd door 60 gr. coli-kaas met 75 cm³ gekookt aq. dest., steriel zand en $\frac{1}{4}$ van een zooveel mogelijk steriel ontnomen pancreas in een steriel mortier af te wrijven, vervolgens gedurende 2 $\frac{1}{2}$ uur in de broedstoof bij 37° C. te plaatsen, en daarna 15 minuten te centrifugeeren. Elke cavia is behandeld met 3 cm³ centrifugaat, hetgeen correspondeert met 6 gram kaas.

Cavia 1A kwam eerst vrij aardig bij uit de narcose, werd echter naderhand weer erg suf, en stierf ruim 1 uur na de injectie, zonder bijzondere verschijnselen als kramp, dyspnoe, cyanose e.d. te hebben vertoond. Bij sectie werd alle ingespoten vloeistof nog in de buikholte aangetroffen. Op het peritoneum waren enkele petechiën te zien; het hart was in diastole blijven staan; verder geenerlei afwijkingen.

Cavia 2A. Als boven; sectie hetzelfde beeld.

Groep B. 1 cavia, gewicht 120 gram; ingespoten met op dezelfde wijze als bij groep A uit normale kaas verkregen extract. De ingespoten hoeveelheid van 3 cm³ centrifugaat correspondeert met pl.m. 8 gram kaas.

Cavia 1B is niet geheel zoo goed bijgekomen als 1A en 2A, maar toch vrij behoorlijk; is later ook weer suf geworden, en na 1 $\frac{1}{2}$ uur gestorven. Sectie als boven, geen petechiën.

De narcose bij al deze 3 dieren is diep en goed geweest. Zij hebben niet de minste symptomen van shock vertoond.

Groep C. 2 caviae van 120 gram elk; ingespoten met het centrifugaat verkregen door 40 gr. coli-kaas met 50 cm³ gekookt aq. dest. met steriel zand op steriele wijze af te wrijven, en daarna gedurende 15 minuten te centrifugeeren. Per cavia is ingespoten 3 cm³, corresponderende met 6 gr. kaas.

Cavia 1C is uit de narcose weer vrij goed bijgekomen, echter niet weer tierig geworden; is zonder bijzondere verschijnselen te hebben vertoond na ongeveer 9 uren gestorven. Bij sectie werden in de buikholte veel vocht en groote fibrinestolsels, waarin Gram+ diplococcen en staafjes, gevonden. Aan het peritoneum waren geen afwijkingen te vinden. De geheele dunne darm was wat rood van kleur; het slijmvlies maakte een eenigszins gezwollen indruk; de darminhoud was wat slijmig tot mucopurulent. In een coupe van den dunnen darm werden geen verschijnselen van enteritis waargenomen. De overige organen waren macroscopisch volkomen normaal.

Cavia 2C kwam aanvankelijk vrij goed bij; was na 9 uren ernstig ziek; het dier vertoonde „Küchenhaltung”, dyspnoe en een eenigszins paretisch achterstel, met sterk verminderde reflexprikkelbaarheid. Er bestond een conjunctivale uitvloeiing. Het dier was na 24 uren dood. Bij sectie bleken alle organen volkomen normaal te zijn, met name was geen spoor van enteritis te ontdekken; daarentegen was de buikholte weer met een troebel sereus vocht, waarin groote fibrinestolsels, gevuld. Ook hier waren weer Gram+ diplococcen en staafjes aan te toonen. Op het peritoneum werden enkele petechiën gevonden. Het hart was in diastole blijven stilstaan.

Groep D omvat 2 caviae, elk van 120 gram, die zijn ingespoten met elk 3 cm³ van een centrifugaat, verkregen uit 45 gr. normale kaas op de wijze als bij groep C omschreven; dit correspondeerde met 8 gram kaas.

Cavia 1D. Het dier was na 9 uren oogenschijnlijk nog volkomen gezond, na 24 uren echter flink ziek; symptomen: opgezette buik, haren overeind, conjunctivale uitvloeiing, verminderde reflexprikkelbaarheid, geen bijzondere dyspnoe. Gestorven na pl.m. 30 uren. Sectie als bij cavia 2C.

Cavia 2D, na 9 uren gezond, na 24 uren volkomen verlamd. Iets conjunctivale uitvloeiing, af en toe clonische krampen der

extremititeiten; geen dyspnoe, cyanose enz. Gestorven na pl.m. 30 uren. Sectie als boven.

Uit deze proevenreeks blijkt dus, dat noch in de coli-bevatende, noch in de normale kaas colitoxinen konden worden aangetoond. Het eenig opvallende was, dat het inspuiten der trypsiextracten veel sneller tot den dood der proefdieren voerde dan de behandeling met niet met dit ferment behandelde kaas, en ook, dat gewoon extract van coli-kaas de diertjes wat vlugger deed sterven dan dat van normale kaas. Waaraan het optreden van peritonitis bij al deze dieren is toe te schrijven is ons een raadsel; bij de behandeling werden precies dezelfde voorzorgen getroffen als bij alle andere groepen van caviae, die op dezelfde wijze werden behandeld.

Wanneer wij samenvatten datgene, dat onze proefnemingen ons hebben geleerd, dan blijkt:

1. dat kaasvergiftiging vrijwel zeker *niet* moet worden toegeschreven aan de aanwezigheid van specifieke toxinen. Geen van deze producten konden wij in vergiftige kaas aantoonen; de nieuwere auteurs (*Karrer*) berichten trouwens over de betrekkelijke ongiftigheid dezer stoffen, met name der ptoëinen.

2. voor de coli-hypothese van *Straub* en *Lerner* konden wij geen doorslaande bewijzen bijbrengen, hoewel er enkele aanwijzingen zijn in sommige der verrichte proeven, dat de coli-achtigen als aetiologisch moment niet buiten beschouwing kunnen worden gelaten.

3. opzettelijk met virulente *B. coli* geënte kaasmelk geeft aanleiding tot de vorming van zeer sterk coli-houdende kaas, waarin ook na 2½ maand de coli-achtigen nog niet in belangrijke mate zijn afgestorven. Ondanks haar zeer hoog gehalte aan deze kiemen, bleek deze kaas niet of bijna niet pathogeen te zijn voor den mensch, zelfs bij gebruik van vrij belangrijke hoeveelheden.

4. het gedrag der met extracten van sterk coli-houdende en normale kaas ingespoten proefdieren vertoont geen typische verschillen.

Indien dus al het colitoxine de oorzaak van de kaasvergiftiging zou kunnen zijn (het onderzoek der vergiftige komijnekaas geeft meerdere aanknoopingspunten voor deze veronderstelling),

dan wordt dit blijkbaar toch alleen maar onder bepaalde omstandigheden gevormd, waaromtrent wij voorloopig nog in het duister tasten. De mogelijkheid bestaat bij voorbeeld, dat de colitoxinen al gepreformeerd in de kaasmelk aanwezig zijn, als de coli-achtigen hierin gedurende geruimen tijd hebben kunnen vegeteeren (bijv. bij kaas maken van oude of z.g.n. retour-melk), of wel, dat zij pas vrij komen, als de coli-achtigen in de kaas zelf zijn afgestorven.

Wij stellen ons voor, het rijpingsproces aan de nog in ons bezit zijne coli-kaas te vervolgen, en te zijner tijd hiermede verdere dierproeven te nemen. Tevens zal overwogen dienen te worden, of de door ons gevolgde extractiemethoden mogelijk door andere — betere — kunnen worden vervangen.

LITERATUUR.

- (1) Bender, W. Zentralblatt für Bakteriologie. 87. blz. 289.
 - (2) Brieger, L. Microbes — Ptomaines et Maladies. 1887 — chez Octave Doin-Paris.
 - (3) Catel ü. Pallaske. Jahrbuch für Kinderheilkunde, 1933.
 - (4) Cleynert, P. C. Ned. Tijdschrift v. Geneeskunde. 1927. blz. 1309.
 - (5) Fleischmann, W. Lehrbuch der Milchwirtschaft. Berlin 1915. blz. 389.
 - (6) Gautier, A. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1892.
 - (7) Heineman, P. G. Milk 1919. Blz. 626. W. B. Saunders, C. J., Philadelphia en London.
 - (8) Hylkema, H. B. Leerboek der Zuivelbereiding.
 - (9) Karrer, P. Lehrbuch der Organischen Chemie. G. Thieme, Leipzig. 1928.
 - (10) Lepierre, Ch. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1894. blz. 476.
 - (11) Moer, Dr. Joh. van der. Pharmaceutisch Weekblad, 1914. blz. 96.
 - (12) Plantenga, B. P. B. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. CIX. 1925. bl. 195/231.
 - (13) Plantenga, B. P. B. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. CXXI. 1928. blz. 156/163.
 - (14) Plantenga, B. P. B. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. CXXIX. 1930. blz. 253/265.
 - (15) Straub, J. en Lerner, M. M. Chemisch Weekblad. 1934. Deel 31 No. 49.
 - (16) Tanner. Mycology and Biology of Foods. 1918.
 - (17) Vaughan, V. C. Zeitschrift für Physiol. Chemie. 1886. X. blz. 146.
 - (18) Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid. 1920. blz. 83.
 - (19) Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid. 1922. blz. 52.
 - (20) Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid. 1923. blz. 27.
 - (21) Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid. 1924. blz. 58.
 - (22) Verslagen en Mededeelingen Volksgezondheid. 1934. blz. 509.
-

